

**PENGARUH PEMBERIAN AMPAS TAHU DAN SUSU  
KAMBING ETAWA TERHADAP EKSPRESI *TNF-  
ALPHA* DAN JUMLAH SEL OSTEOKLAST TULANG  
MANDIBULA SEBAGAI PENCEGAHAN  
OSTEOPOROSIS PADA TIKUS (*RATTUS  
NORVEGICUS*) PASCA OVARIEKTOMI**

**SKRIPSI**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2017**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

# **Pengaruh Pemberian Ampas Tahu dan Susu Kambing Etawa terhadap Ekspresi *TNF-Alpha* dan Jumlah Sel Osteoklast Tulang Mandibula sebagai Pencegahan Osteoporosis pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Pasca Ovariectomi**

Oleh :  
**NURUL HIDAYAH**  
**135130101111074**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
Pada tanggal 18 Januari 2018  
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr.drh. Masdiana C. Padaga MApp,Sc**  
**NIP. 19580127198503 2 001**

**Drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech**  
**NIP. 19870501201504 1 001**

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
**NIP. 19600903 198802 2 001**

## IDENTITAS TIM PENGUJI

1. Drh. Rahadi Swastomo
2. Drh. Ajeng Aeka M.Sc



## DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama : Nurul Hidayah

Tempat/ Tanggal lahir: Probolinggo/ 13 Juni 1995

Alamat : Desa Triwungan, Kecamatan Kotaanyar  
Kabupaten Probolinggo



## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan kepada Allah SWT yang memberikan kuasa atas makhluknya menyelesaikan tugas skripsi ini. Ucapan terima kasih juga diberikan kepada Ibu Hosnawiyah dan Bapak Haeri yang telah memberikan semangat dan nasihat dalam penyelesaian naskha skripsi ini.



## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini.

Nama : Nurul Hidayah

NIM : 135130101111074

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul : Pengaruh Pemberian Ampas Tahu dan Susu Kambing Etawa terhadap Ekspresi *TNF-Alpha* dan Jumlah Sel Osteoklast Tulang Mandibula sebagai Pencegahan Osteoporosis pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Pasca Ovariektomi

Dengan ini saya menyatakan bahwa :

1. Skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis didaftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Januari 2018  
Yang menyatakan,

(Nurul Hidayah)  
NIM.135130101111074

**Pengaruh Pemberian Ampas Tahu dan Susu Kambing Etawa terhadap  
Ekspresi *TNF-Alpha* dan Jumlah Sel Osteoklast Tulang Mandibula  
sebagai Pencegahan Osteoporosis pada Tikus (*Rattus norvegicus*)  
Pasca Ovariektomi**

**ABSTRAK**

Osteoporosis merupakan gangguan yang menyebabkan pengeroposan massa tulang. Osteoporosis dapat disebabkan rendahnya kalsium dan akibat menopause. Hal tersebut dapat dicegah dengan pemberian ampas tahu dan susu kambing etawa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ampas tahu dan susu etawa terhadap ekspresi *TNF Alpha* dan jumlah sel osteoklast dalam mencegah osteoporosis pada tulang mandibula. Penelitian ini menggunakan 20 tikus betina (*Rattus Norvegicus*) yang dilakukan ovariektomi untuk mendapatkan kondisi menopause, kemudian dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok A (kontrol negatif), kelompok B (kontrol positif), kelompok C, D, E dilakukan pemberian masing-masing kelompok dengan ampas tahu 0,159 g/ekor, susu kambing etawa 0,3 ml/ekor, dan campuran (ampas tahu 0,159 g + susu kambing etawa 0,3 ml) yang diberikan satu kali sehari secara sonde lambung pada minggu ke-I sampai 4. Kemudian dilakukan euthanasi dan pengambilan tulang mandibula. Penentuan jumlah osteoklast dilakukan dengan cara pengamatan pada preparat HE (*Hematoxylin eosin*) secara 5 lapang bidang pandang dengan perbesaran 400x. Sedangkan analisa ekspresi *TNF Alpha* dilakukan dengan pengamatan preparat *imunohistokimia* secara mikroskopik (400x), dilanjutkan dengan menggunakan aplikasi *imunoratio*. Kelompok A, B, C, D dan E menunjukkan hasil ekspresi *TNF Alpha* berturut-turut yaitu; 16,76%, 46,58%, 26,07%, 34,74%, dan 19,52%. Hasil rata-rata jumlah osteoklast berturut-turut yaitu; 1,45; 3,20; 2,10; 2,67; dan 1,65 sel/ bidang pandang. Kesimpulan penelitian ini adalah perlakuan pemberian dengan campuran ampas tahu (okara) dan susu kambing etawa mampu menekan ekspresi *TNF Alpha* dan jumlah sel osteoklast kembali sama seperti keadaan tikus normal.

Kata Kunci: Osteoporosis, Menopause, Ampas Tahu, Susu Etawa, Tulang Mandibula, *TNF Alpha*, Osteoklast,

**The Effect of Okara and Etawa Goat Milk on *TNF-Alpha* Expression and the Number of Osteoclast Cells of Mandibular Bone as Osteoporosis Prevention on Rats (*Rattus norvegicus*) Post-Ovariectomy**

**ABSTRACT**

Osteoporosis is a disorder that causes bone mass loss. Osteoporosis can be caused by low calcium and menopausal effects. This can be prevented by the provision of okara and etawa goat milk. This study aims to determine the effect of okara and milk etawa on *TNF Alpha* expression and the number of osteoclast cells in preventing osteoporosis in the mandible bone. This research used 20 female rats (*Rattus norvegicus*) which was done by ovariectomy to get menopause condition, then divided into 5 groups, group A (negative control), group B (positive control), group C, D, E were administered by each group with 0.159 g / head of okara, 0.3 ml / head of etawa goat milk, and mixed (okara 0.159 g + etawa goat milk 0.3 ml) given once daily in stomach tube in weeks 1 to 4. Then, the rats were euthanated and mandibular bone collection. Measurement of osteoclast number is done by observation on *HE* slides (*Hematoxylin-eosin*) in 5 field of view by 400x magnification. Meanwhile, expression *TNF Alpha* was examined by immunohistochemical slides (400x), then by imunoratio software. Groups A, B, C, D and E show the results of *TNF Alpha* expression were; 16.76%, 46.58%, 26.07%, 34.74% and 19.52% respectively. The average number of osteoclasts were; 1.45; 3.20; 2.10; 2.67; and 1.65 cells/field of view. The conclusion of this study was the treatment of mixed with okara and etawa milk was able to suppress *TNF Alpha* expression and osteoclasts cells number could back to normal level.

**Keywords:** Osteoporosis, Menopause, Okara, Etawa Goat Milk, Mandibule, *TNF Alpha*, Osteoklast,



## KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT. atas rahmat yang diberikan sehingga Skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ampas Tahu dan Susu Kambing Etawa terhadap Ekspresi *TNF-Alpha* dan Jumlah Sel Osteoklast Tulang Mandibula sebagai Pencegahan Osteoporosis pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Pasca Ovariectomi” ini dapat terselesaikan. Kegiatan skripsi ini dilaksanakan sebagai persyaratan untuk lulus Sarjana Kedokteran Hewan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Dalam penulisan proposal ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada pihak-pihak yang membantu dalam menyelesaikan proposal ini, khususnya kepada :

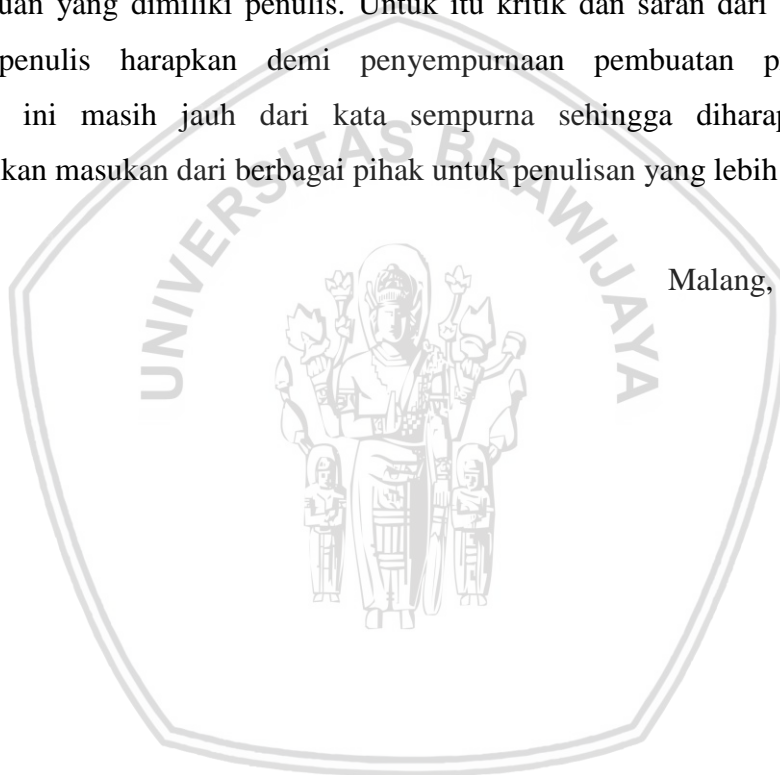
1. Dr. drh. Masdiana Padaga C. M.App,Sc selaku dosen pembimbing yang telah berkenan memberikan bimbingan, waktu, kesabaran, motivasi dan bantuan dalam penulisan proposal skripsi ini.
2. drh. Fajar Shodiq Permata M.Biotech, selaku dosen pembimbing yang telah berkenan memberikan bimbingan, waktu, kesabaran, motivasi dan bantuan dalam penulisan proposal skripsi ini.
3. drh. Rahadi Swatomo, selaku dosen penguji yang telah ikut terlibat dalam memberikan nasihat, kritik dan saran dalam penulisan proposal skripsi ini.
4. drh. Ajeng Aeka M.Sc, selaku dosen penguji yang telah ikut terlibat dalam memberikan nasihat, kritik dan saran dalam penulisan proposal skripsi ini.
5. drh. Aldilla Noviatry, selaku dosen penguji yang juga terlibat memberikan nasihat dalam penulisan skripsi ini.
6. Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan FKH UB tercinta.
7. Bapak Haeri dan Ibu Hosnawiyah sebagai orang tua yang telah memberikan dukungan yang tak terhingga dan penuh berupa doa, moral dan materil dalam penyelesaian penulisan proposal ini.

8. Sanak saudara sekalian, yang tak lupa juga memberikan dukungan dan nasihat dalam pengerjaan proposal ini.
9. Teman-teman di rumah, teman-teman kelas PKH D 2013, teman-teman FKH kolega yang selalu menjadi motivasi dan inspirasi dalam pengerjaan proposal ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan proposal ini penulis merasa masih banyak kekurangan pada teknis penulisan maupun materi, mengingat akan kemampuan yang dimiliki penulis. Untuk itu kritik dan saran dari semua pihak sangat penulis harapkan demi penyempurnaan pembuatan proposal ini. Proposal ini masih jauh dari kata sempurna sehingga diharapkan dapat memberikan masukan dari berbagai pihak untuk penulisan yang lebih baik.

Malang, Januari 2018

Penulis

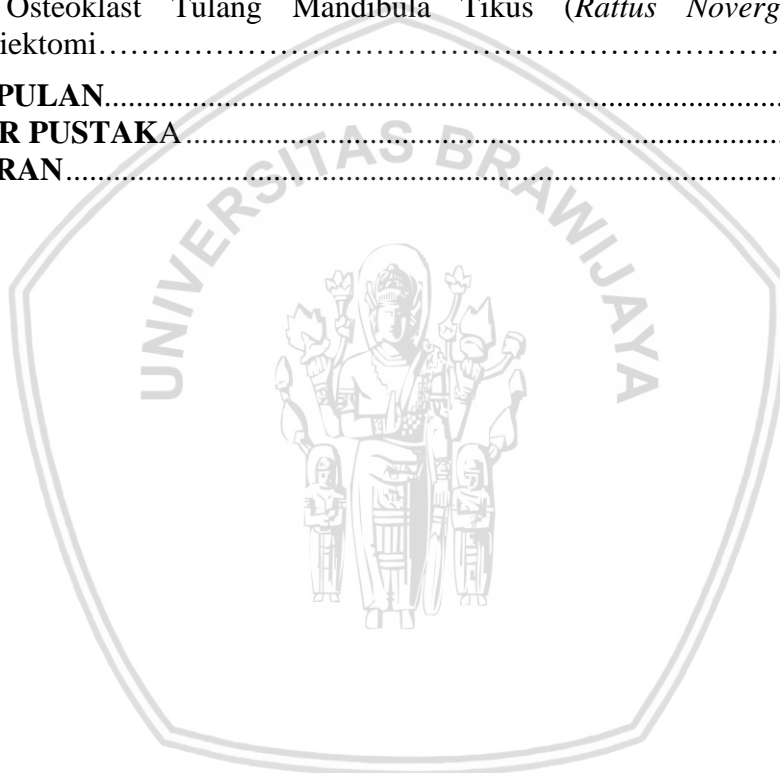


## DAFTAR ISI

## Halaman

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG</b> .....	xiii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	2
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	4
1.5 Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
2.1 Osteoporosis .....	5
2.2 Tulang .....	5
2.2.1 Struktur dan Komposisi Tulang .....	6
2.2.2 Sel Osteoblas dan Osteoklas pada Tulang .....	7
2.2.3 Tulang Mandibula .....	8
2.3 Hewan Coba Tikus ( <i>Rattus Norvegicus</i> ) .....	8
2.4 Peran Estrogen dan Kalsium pada Tulang .....	9
2.5 <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> ( <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> ) .....	11
2.6 Ampas Tahu .....	13
2.7 Susu Kambing Etawa .....	14
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....	15
3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	15
3.2 Hipotesa Penelitian .....	18
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b> .....	19
4.1 Tempat dan Tempat Penelitian .....	19
4.2 Alat dan Bahan .....	19
4.2.1 Alat Penelitian .....	19
4.2.2 Bahan. Penelitian .....	19
4.3 Tahapan Penelitian .....	20
4.4 Prosedur Kerja .....	20
4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba .....	20
4.4.2 Persiapan Bahan Penelitian .....	21
4.4.2.1 Persiapan Ampas Tahu .....	21
4.4.2.2 Persiapan Susu Kambing Etawa .....	22

4.4.3 Ovariectomi Pada Hewan Coba Tikus.....	22
4.4.4 Pemberian Perlakuan Hewan Coba.....	23
4.4.5 Pengambilan Sampel Tulang.....	24
4.4.6 Analisa Jumlah Sel Osteoklast .....	24
4.4.7 Analisa Ekspresi <i>TNF Alpha</i> .....	24
4.4.8 Analisa Data .....	25
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>26</b>
5.1 Pengaruh Pemberian Ampas Tahu dan Susu Kambing Etawa Terhadap Ekspresi <i>TNF Alpha</i> Pada Tulang Mandibula Tikus ( <i>Rattus Novergicus</i> ) Pasca Ovariectomi.....	26
5.2 Pengaruh Pemberian Ampas Tahu dan Susu Kambing Etawa Terhadap Jumlah Sel Osteoklast Tulang Mandibula Tikus ( <i>Rattus Novergicus</i> ) Pasca Ovariectomi.....	33
<b>KESIMPULAN.....</b>	<b>44</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>45</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>48</b>



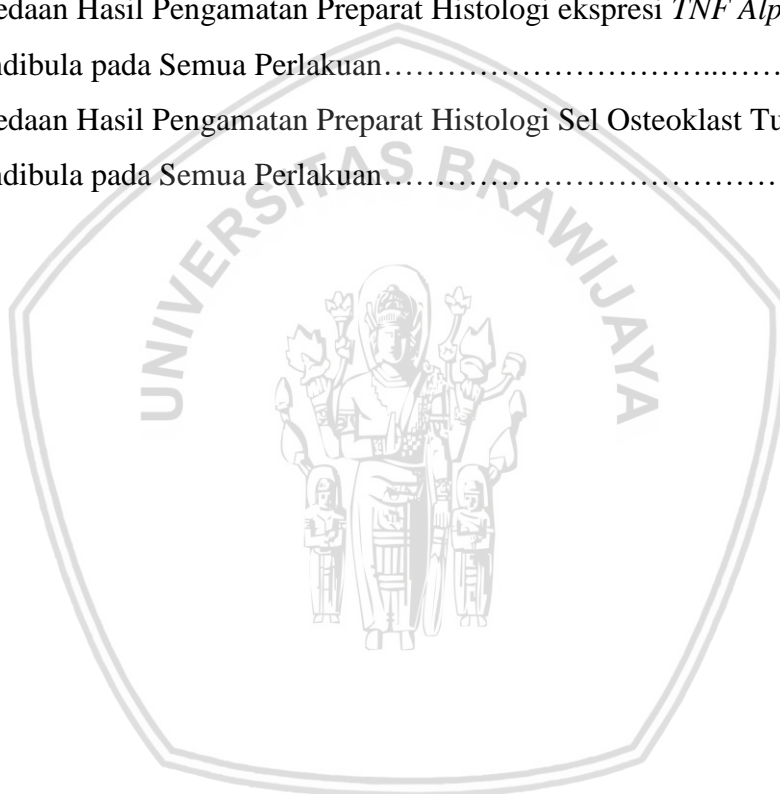
## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Rata-rata Ekspresi <i>TNF Alpha</i> masing-masing kelompok perlakuan.....	26
5.2 Rata-rata Jumlah sel osteoklast masing-masing perlakuan.....	33



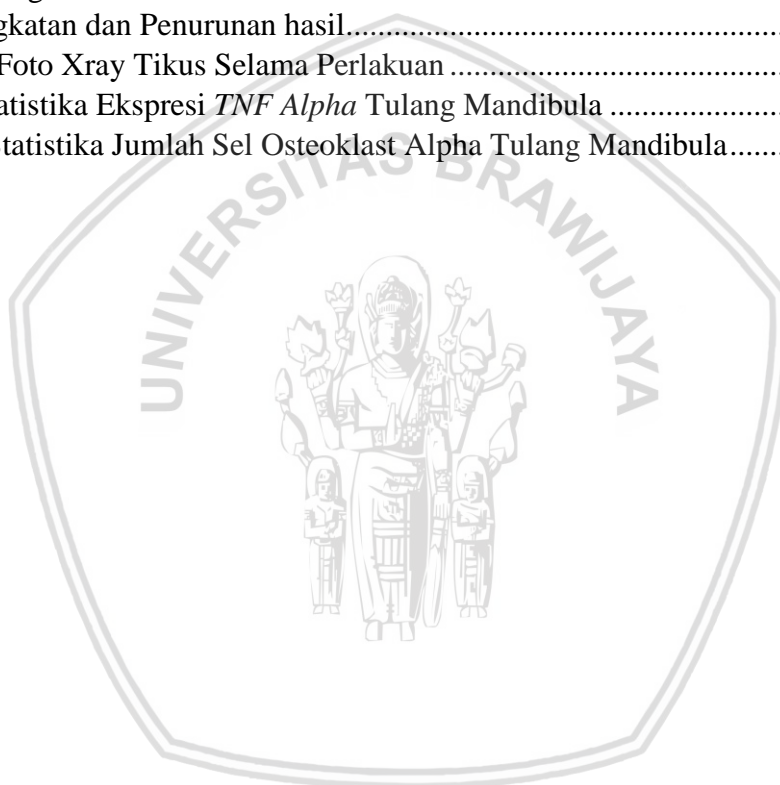
## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur tulang normal .....	6
2.2 Histologi Osteoblast pada tulang normal .....	7
2.3 Histologi Osteoklast pada tulang normal .....	7
3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	15
5.1 Perbedaan Hasil Pengamatan Preparat Histologi ekspresi <i>TNF Alpha</i> Tulang Mandibula pada Semua Perlakuan.....	27
5.2 Perbedaan Hasil Pengamatan Preparat Histologi Sel Osteoklast Tulang Mandibula pada Semua Perlakuan.....	34



## DAFTAR LAMPIRAN

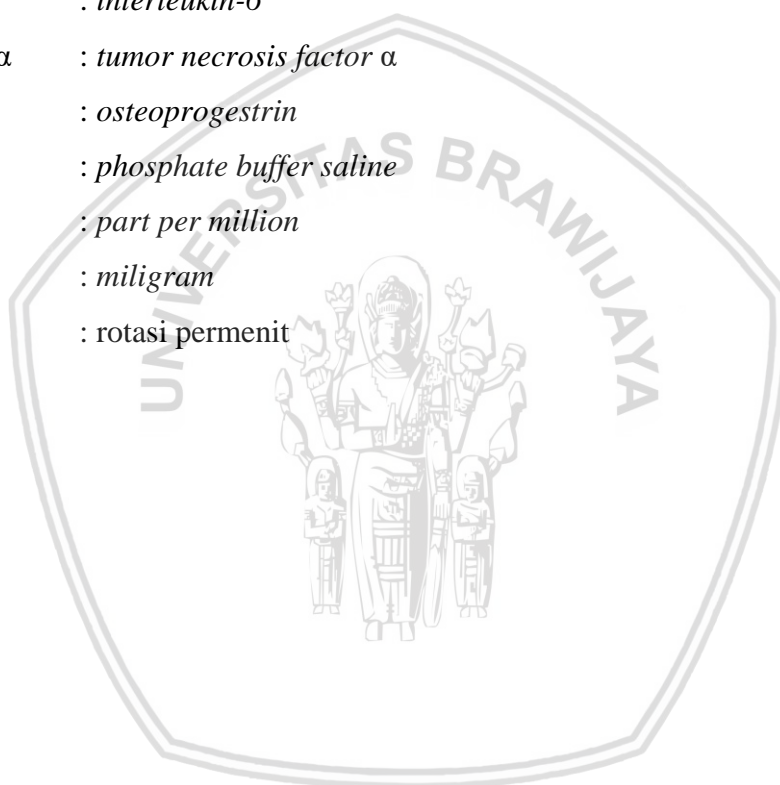
Lampiran	Halaman
1. Surat Keterangan Laik Etik .....	48
2. Diagram Alir Penelitian Pembuatan Preparat Histologi Os Mandibula .....	49
3. Metode Pembuatan Preparat HE Os Mandibula .....	50
4. Bagan Alur Pewarnaan Imunohistokimia .....	51
5. Penentuan Pemberian Ampas Tahu .....	52
6. Perhitungan Dosis Susu Etawa .....	53
7. Peningkatan dan Penurunan hasil .....	54
8. Hasil Foto Xray Tikus Selama Perlakuan .....	56
9. Uji Statistika Ekspresi <i>TNF Alpha</i> Tulang Mandibula .....	57
10. Uji Statistika Jumlah Sel Osteoklast Alpha Tulang Mandibula .....	58



## DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

### Simbol dan Singkatan    Keterangan

ANOVA	: <i>Analisis of variant</i>
BNJ	: beda nyata jujur
Ca	: <i>calcium</i>
IL-1	: <i>interleukin-1</i>
IL-6	: <i>interleukin-6</i>
TNF- $\alpha$	: <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
OPG	: <i>osteoprogestrin</i>
PBS	: <i>phosphate buffer saline</i>
ppm	: <i>part per million</i>
mg	: <i>miligram</i>
rpm	: rotasi permenit





## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Osteoporosis merupakan gangguan kepadatan tulang berupa massa tulang yang rendah atau berkurang, sehingga menimbulkan kerapuhan bahkan patah tulang karena matriks dan mineral tulang berkurang. Penyebab osteoporosis diantaranya kurang asupan kalsium dan pasca menopause yang terjadi karena kurangnya hormon estrogen untuk membantu pengangkutan kalsium ke dalam tulang. Gejala menopause timbul pada wanita berusia 51-75 tahun. Menurut WHO, terdapat 200 juta orang di dunia menderita osteoporosis. Selama 5-10 tahun pertama setelah menopause, wanita bisa kehilangan 2%-4% massa tulang per tahun sehingga mengakibatkan 25%-30% kehilangan kepadatan tulang selama jangka waktu tersebut (Meita, 2011). Osteoporosis dapat dicegah dengan mengkonsumsi makanan bergizi dengan unsur kaya kalsium (1.000-1200 mg kalsium per hari).

Susu merupakan produk pangan yang menjadi sumber utama pemenuhan kebutuhan kalsium (Ca) tubuh (Syarifah, 2007). Namun, produk susu yang dipasarkan saat ini diutamakan hanya kadar kalsium. Sedangkan pembentukan tulang memerlukan peran kalsium dan hormon seperti estrogen. Hormon estrogen bekerja pada tulang melalui daya afinitas tinggi terhadap reseptor-reseptor osteoblast dan osteoklast dengan efek utamanya mempertahankan keseimbangan kepadatan tulang. Defisiensi estrogen secara menurut (Potu et al., 2009), tidak langsung mempengaruhi hormone pengatur kalsium (PTH dan VitaminD) dan

sitokin pro inflamasi (IL 1, IL 6, dan *TNF Alpha*) dan kalsium akan menyebabkan terjadinya osteoklasgenesis yang meningkat dan berlanjut dengan kehilangan tulang akibat resorpsi tulang meningkat. Sehingga apabila hanya kalsium yang berperan, pencegahan osteoporosis dan upaya pengembalian keutuhan tulang tidak maksimal.

Kalsium dalam tubuh didapatkan dari beberapa bahan yang dikonsumsi salah satunya susu kambing etawa. Susu kambing etawa mengandung kadar kalsium 134 gr/100 ml (Ferichani, 2012). Sedangkan hormon estrogen apabila didapatkan dari luar asupan tubuh, dalam bentuk fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan dekomposisi alami yang ditemukan pada tumbuhan sebagai hormon estrogen alami. Fitoestrogen bersifat polar (larut dalam air) sehingga banyak terdapat pada ampas tahu.

Osteoporosis dapat dicegah secara maksimal apabila mengkonsumsi asupan makanan yang mengandung kalsium dan fitoestrogen. Hal tersebut diharapkan dapat merangsang aktivitas osteoblast serta menghambat kerja hormon paratiroid merangsang osteoklast dalam pengeroposan kepadatan tulang. Pengeroposan tulang dapat dilihat berdasarkan gambaran histopatologi jumlah sel osteoblast dan sel osteoklast serta ekspresi *TNF Alpha* pada tulang karena merupakan pro inflamasi pada destruksi tulang (Aruan, 2015). Oleh karena itu, diperlukan penelitian pemberian ampas tahu dan susu kambing etawa dalam upaya mencegah osteoporosis akibat ovariectomi pada hewan coba tikus. Inovasi tersebut diharapkan mampu menjadi produk alternatif untuk upaya pencegahan dan menurunkan resiko osteoporosis secara maksimal akibat menopause.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah yang akan diselesaikan adalah:

1. Bagaimana pengaruh pemberian ampas tahu dan susu kambing etawa terhadap ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* pada tulang mandibula hewan pasca ovariektomi?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ampas tahu dan susu kambing etawa terhadap jumlah sel osteoklas pada tulang mandibula hewan pasca ovariektomi?

## 1.3 Batasan Penelitian

Berdasarkan latar belakang di atas maka penelitian yang dilakukan dibatasi pada:

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus betina galur Wistar (*Rattus novergicus*) dewasa berusia 8 – 12 minggu dengan berat badan 180 – 200 gram dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang yang telah mendapatkan persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya, No: 665-KEP-UB (Lampiran 1).
2. Model osteoporosis pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) dilakukan dengan cara melakukan ovariektomi pada hewan coba tikus.
3. Volume pemberian ampas tahu 0,3 ml (0,159 g dalam aquades sampai 0,3 ml) diperoleh dari perusahaan tahu sukun 73, susu kambing etawa sebanyak 0,3 ml (diperoleh dari Usaha Produksi Susu Kambing Malang ) dan kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa dengan cara 0,159 g ampas tahu dalam 0,3 ml susu kambing etawa.

4. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* pada tulang mandibula dengan pewarnaan IHK dan diamati dengan mikroskop elektrik perbesaran 400x pada 5 lapang pandang kemudian dianalisa secara kuantitatif menggunakan software *imunoratio* dan jumlah sel osteoklas tulang mandibula dengan pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE) diamati menggunakan mikroskop elektrik perbesaran 400x pada 5 lapang pandang, kemudian dianalisa secara kuantitatif menggunakan software *image raster 3*.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan maka tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* pada tulang mandibula hewan model osteoporosis pasca ovariectomi setelah mendapat pemberian ampas tahu dan susu kambing etawa.
2. Mengetahui jumlah osteoklast tulang mandibula pada hewan coba pasca ovariectomi setelah mendapat pemberian ampas tahu dan susu kambing etawa.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi tentang potensi pemberian susu pemberian ampas tahu dan susu kambing etawa pada hewan model osteoporosis pasca ovariectomi berdasarkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* dan jumlah sel osteoklas pada tulang mandibula.

## BAB II

### TINAJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Osteoporosis

Osteoporosis merupakan istilah umum untuk suatu penyakit tulang yang menyebabkan berkurangnya jaringan tulang dan tidak normalnya struktur atau bentuk mikroskopis tulang (Cosman, 2009), dalam hal ini (Sabri, 2011; Anderson et al., 2008), mengemukakan bahwa perubahan yang terjadi mencakup pengurangan massa tulang, mineral tulang dan matriks tulang sehingga kepadatan tulang berkurang atau tulang menjadi keropos. Ketidaktahuan bahwa menderita *osteoporosis* sampai ketika tulang sedemikian lemah, regangan tubuh yang mendadak, persinggungan, ataupun jatuh menyebabkan patah tulang. Karena itu, tak berlebihan jika penyakit ini disebut *silent disease* (penyakit diam-diam). *Osteoporosis* disebut juga penyakit tulang rapuh atau tulang keropos. Diistilahkan *silent disease* karena sering tidak memberikan gejala hingga pada akhirnya terjadi fraktur (patah). Dengan kata lain *osteoporosis* adalah dicirikan oleh rendahnya massa tulang dan kemunduran struktural jaringan tulang, yang menyebabkan kerapuhan tulang. Bila tidak dicegah atau bila tidak ditangani, proses pengeroposan akan terus berlanjut sampai tulang menjadi patah dan penderitanya mengalami kesakitan dalam melakukan pergerakan anggota tubuhnya.

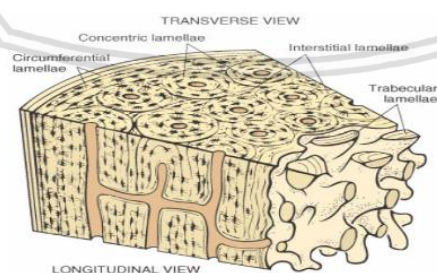
#### 2.2 Tulang

Tulang merupakan gabungan biokeramik yang memiliki struktur dan komposisi organik namun memiliki kekuatan yang baik (Olszta et al., 2007). Tulang mempunyai fungsi utama yaitu sebagai penunjang tubuh, dan

perlindungan jaringan tubuh lunak. Tulang ini terbagi menjadi dua bagian pada tubuh yaitu tulang aksial dan apendikular. Tulang *axial* merupakan tulang yang menjadi poros tubuh yang terdiri dari tulang tengkorak, *ossa collumna vertebrales*, *ossa costales*, *os sternum* dan *os hyoid*. Tulang apendikular meliputi anggota gerak pada tubuh yaitu kaki depan dan kaki belakang (Colville dan Bassert, 2002).

### 2.2.1 Struktur dan Komposisi Tulang

Tulang secara garis besar dikenal dua struktur/tipe yaitu tulang korteks (80%) dan tulang trabekular. Tulang korteks merupakan bagian luar yang padat sebagai penyusun kerangka, dan mampu menahan tekanan mekanik beban tubuh misalnya ; Tulang *vertebrae* dan tulang ekstremitas. Sedangkan trabecular merupakan lapisan bagian dalam dengan kolagen yang mengalami mineralisasi lebih cepat sehingga elastisitasnya kecil, tulang tersebut terdapat pada bagian metafisis dan epifisis tulang panjang dan sebagian besar pada tulang pendek (Olszta, 2007).



**Gambar 2.1** Struktur tulang normal (Clarke, 2008).

Komposisi tulang terdiri dari 2 bahan, yaitu: Matrik yang kaya mineral (70%) sama dengan tulang yang sudah matang (*bone*). Bahan organik (30%) yang terdiri dari: Sel (2%) termasuk sel osteoblast yaitu yang membuat matrik (bahan)

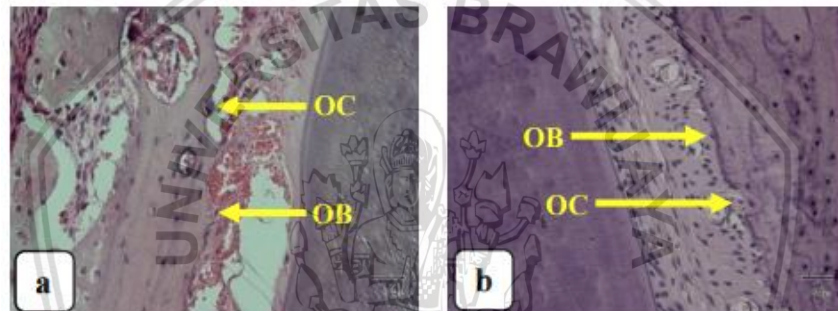


tulang/ sel pembentuk tulang, merupakan sel tulang muda yang kerjanya berlawanan dengan osteoklast. Sel *osteocyte* yaitu mempertahankan matrik tulang. Sel *osteoclast* yaitu sel yang menyerap tulang atau menyerap (*resorpsi*) *osteoid*. *Osteoid* (98%) sama dengan tulang muda yaitu matrik (bahan) tulang yang mengandung sedikit mineral (Olszta, 2007).

### 2.2.2 Sel Osteoblas dan Osteoklas pada Tulang

Osteoblas adalah sel mononuklear yang menempel pada permukaan tulang dan membentuk tulang baru. Osteoblas menghasilkan kolagen tipe I dan matriks komponen osteoid lainnya dan mereka juga memineralisasi osteoid dengan hidroksiapatit (Singer, 2008). Osteoblas berasal dari sel mesenkimal sumsum tulang. Osteoblas ini berfungsi memproduksi osteid atau matriks tulang, berbentuk bulat, oval atau *polyhedral* terpisah dari matriks yang telah mengalami mineralisasi dan mensintesis serta mensekresi matriks organik tulang, mengatur perubahan elektrolit cairan ekstraselular pada proses mineralisasi. Sel ini mengansung retikulum endoplasmic, membrane golgi dan mitokondria. Osteoblast memiliki reseptor estrogen, sitokin, *Paratiroid hormone (PTH)*, *Insulin derivated growth factor (IGF)*, dan vitamin D3. Osteoklas berasal dari jalur hemopoetik yaitu makrofag dan monosit. Sel ini mengalami differensiasi dari sumsum tulang dan sirkulasi darah. Prekursor sel osteobklas terdapat pada sumsum tulang yang mengalami resorpsi dan kemudian membentuk cekungan yang dikenal dengan lakuna hawchaps. Osteoklas dalam sitoplasmanya terisi oleh mitokondria untuk menyediakan energi saat proses resorpsi tulang. Osteoklas merusak matriks tulang, melekat pada permukaan tulang, memisahkan sel dengan matriks.

Osteoklas memiliki reseptor yaitu RANK ligand (RANK L) untuk maturasi sel dan mengalami apoptosis. Osteoklas adalah satu-satunya sel yang dikenal mampu penyerap tulang osteoklas berinti yang berasal dari sel-sel prekursor mononuklear dari *monocytemacrophage* (Siki, 2009). Sel prekursor monosit-makrofag mononuklear telah diidentifikasi dalam berbagai jaringan, tetapi sel-sel prekursor sumsum tulang monosit-makrofag diduga menimbulkan sebagian osteoklas (Clarke, 2008).



**Gambar 2.2** Histologi Osteoblast (OB) dan Osteoklast (OC) pada tulang normal (Hikmah, 2015).

### 2.2.3 Tulang Mandibula

Tulang mandibula merupakan tulang terbesar dan terkuat di bagian wajah, berfungsi untuk penyangga gigi. Tulang mandibula terdiri dari bagian melengkung, bagian horizontal, corpus, dan dua bagian tegak lurus, rami yang bersatu dengan ujung tubuh hampir disudut kanan. Secara garis besar tulang mandibular dibagi menjadi tiga bagian yaitu: Badan mandibula, Rami, Saluran Pembuluh (Elsabaa, 2012).

### 2.3 Hewan Coba Tikus (*Rattus Novergicus*)

Menurut Adiyati (2011), hewan coba merupakan hewan yang dikembangkan untuk digunakan sebagai hewan uji coba. Tikus sering digunakan pada



berbagai macam penelitian medis selama bertahun-tahun. Hal ini dikarenakan tikus memiliki karakteristik genetik yang unik, mudah berkembang biak, murah serta mudah untuk mendapatkannya. Tikus merupakan hewan yang melakukan aktivitasnya pada malam hari (*nocturnal*). Tikus memiliki beberapa galur yang merupakan hasil perkembang biakkan sesama jenis atau persilangan. Klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* menurut Adiyati (2011).

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) atau biasa dikenal dengan nama lain *Norway Rat* berasal dari wilayah Cina dan menyebar ke Eropa bagian barat (Sirois 2005). Tikus *Wistar* saat ini menjadi salah satu yang strain tikus paling populer yang digunakan untuk penelitian laboratorium. Hal ini ditandai oleh kepala lebar, telinga panjang, dan memiliki panjang ekor yang selalu kurang dari panjang tubuhnya. Tikus *Wistar* lebih aktif (agresif) daripada jenis lain seperti tikus *Sprague dawley* (Sirois, 2005). Tikus putih merupakan strain albino dari *Rattus norvegicus*. Tikus *wistar* memiliki umur pubertas yang matang pada hari ke 50 sampai 60 usianya. Sedangkan lama kebuntingannya berkisar antara 21 sampai 22 hari (Paschal, 2006).

#### **2.4 Peran Estrogen dan Kalsium pada Tulang**

Reseptor estrogen dapat ditemukan pada sel osteoklas maupun osteoblas. Estrogen telah lama dikenal sebagai agen antiresorptif yang bekerja terutama dengan menekan aktivitas osteoklastik. Estrogen bekerja dengan menekan diferensiasi osteoklas. Pembentukan osteoklas memerlukan interaksi antara RANK (*receptor activator nuclear factor kappa B*, NF- $\kappa$ B) dan ligannya, RANKL. Interaksi antara RANK dan RANKL ini diregulasi oleh produksi

osteoprotegerin (OPG). Estrogen mengendalikan diferensiasi osteoklas dengan cara menghambat interaksi antara RANK dan RANKL. Estrogen pun dapat menghambat produksi IL-6, IL-1 dan atau TNF- $\alpha$ , IL-11, IL-7 dan TGF- $\beta$  yang juga penting dalam diferensiasi osteoklas. Lama hidup osteoklas juga menentukan jumlah sel osteoklas pada permukaan resorpsi tulang. Estrogen dapat menginduksi apoptosis dan kematian osteoklas sehingga dapat secara langsung menurunkan aktivitas resorpsi.

Efek estrogen dalam menekan aktivitas osteoklastik dapat terjadi secara tidak langsung melalui aksinya pada reseptor osteoblastik. Salah satu sitokin yang diproduksi oleh osteoblas, TGF- $\beta$ , ditekan produksinya oleh estrogen. TGF- $\beta$  berperan dalam diferensiasi osteoklas serta kelangsungan hidupnya. Estrogen pun menstimulasi produksi OPG (osteoprotegerin) oleh osteoblas. OPG merupakan reseptor TNF yang penting dalam menghambat diferensiasi dan aktivitas osteoklas. Estrogen juga mengendalikan aktivitas osteoklastik dengan menekan produksi interleukin-6 (IL-6) yang diproduksi osteoblast (Sihomibing, 2012).

Disisi lain, hormon estrogen dapat merangsang ekspresi osteoprotegerin (OPG) dan TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) pada sel osteoblas dan sel stroma yang lebih lanjut dapat menghambat penyerapan tulang dan meningkatkan apoptosis sel osteoklas (Chen, 2009). Sembilan puluh sembilan persen kalsium ekstrasel terdapat dalam tulang dalam bentuk hidroksiapatit yang mencerminkan keseimbangan antara proses pembentukan dan resorpsi tulang (Setyorini dkk,2011).

Defisiensi estrogen dapat menstimulasi proses osteoklastogenesis yang menyebabkan kehilangan massa tulang. Pemberian estrogen eksogen dapat menstimulasi pembentukan tulang kembali. Estrogen berperan penting dalam mengatur efek hormon paratiroid (PTH) pada tulang yang mana pada kadar tertentu dapat menurunkan kadar kalsium dalam serum, urin, dan pada wanita pasca menopause. Hormon estrogen juga berpengaruh pada metabolisme vitamin-D, mengakibatkan penurunan absorpsi kalsium di usus yang disebabkan karena menurunnya kadar 1,25-OH-D3. Estrogen merangsang hormone kalsitonin dalam menghambat aktivasi dan diferensiasi osteoklast (Manolaagas, 2013).

## **2.5 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- Alpha)**

Tumor Nekrosis Alpha merupakan suatu sitokin yang berperan dalam proses inflamasi yang terjadi pada tubuh. Hal ini berkaitan dengan timbulnya stimulasi *Tumor Necrosis Factor Alpha* yang berada dalam *bone marrow* berdiferensiasi. Diferensiasi yang terjadi mengakibatkan terjadinya proses pembengkakan dan pelepasan inflamasi pada daerah yang mengalami kekurangan kalsium. Pada stadium awal hematopoiesis dan osteoklasogenesis, melalui suatu jalur yang memerlukan suatu mediator berupa sitokin dan faktor koloni stimulator. Diantara group sitokin tersebut yang menstimulasi osteoklasogenesis antara lain adalah: IL 3, IL 5, IL6, *Leukimia Inhibitory Factor* (LIF), *Tumor Necrosis Factor* (TNF Alpha), *Tumor Growth Factor* (TGF), *Granulocyte Macrophage Colony Stimulator Factor* (GMCSF), dan *Macrophage Colony Stimulating Factor* (MCSF), sedangkan IL 4, IL10, IL 11, IL 18 dan Interferon Gama, merupakan sitokin yang menghambat osteoklasogenesis (Shin et al, 2007).

Produksi *Tumor Necrosis Factor Alpha* diproduksi oleh sel makrofag sebagai respon terhadap antigen seperti liposakarida dimana sel mesenkimal yang berada pada sumsum tulang yang merupakan prekursor dari hematopoetik yang memerankan system imun (Suwanti, 2015). *Tumor Necrosis Factor Alpha* merupakan salah satu sitokin berperan dalam proses inflamasi yang terjadi pada tubuh, termasuk pada kondisi tulang arthritis, osteopenia, serta osteoporosis. Proses inflamasi pada osteoporosis diketahui sebagai Co lokasi daerah osteoporosis dengan daerah inflamasi. Sitokin pro osteoklas seperti *Tumor Necrosis Factor Alpha* dan Interleukin 6 meningkat pada kondisi gout, osteomyelitis, Rheumatoid arthritis, ankylosing Spondylitis, Psoriatic arthritis, yang berhubungan erat dengan inflamasi. Profil yang tampak sama dengan sitokin yang mengatur resorpsi tulang (Shin et al, 2007). *Tumor Necrosis Alpha* merupakan sitokin yang menyebabkan destruksi tulang dengan bekerja secara langsung dalam diferensiasi dan maturasi osteoklast serta secara tidak langsung mengekspos matriks tulang (Aruan, 2015). *Tumor Necrosis Factor Alpha* akan menstimulasi diferensiasi dan maturasi osteoklast yang mana sel sel tersebut terlibat dalam mengeluarkan kolagenase dan enzim proteolitik lain yang menyebabkan matriks tulang melepaskan bagian substansi dasar yang mengapur atau dapat bereaksi pada matriks tulang, memaparkannya terhadap osteoklast. Hal tersebut dapat mengakibatkan degradasi ekstraselular tulang sehingga terjadi erosi atau destruksi tulang yang menyebabkan pengeroposan tulang (Shin et al, 2007).

## 2.6 Ampas Tahu

Ampas tahu merupakan limbah dari pembuatan tahu yang cukup banyak ketersediaannya tetapi pemanfaatannya masih terbatas. Ampas tahu memiliki kandungan gizi seperti protein, lemak, kalsium karbohidrat, vitamin K, dan mineral serta kandungan fitoestrogen. Menurut Muis (2009), ampas tahu memiliki kandungan protein dan fitoestrogen yang tinggi, sehingga dapat digunakan sebagai bahan substitusi guna. Fitoestrogen digunakan untuk mencegah penyakit osteoporosis pada kondisi menopause karena terjadinya penurunan estrogen (Marini, 2007; Cummings, 2011). Selain nutrisinya, ampas tahu memiliki harga yang jauh lebih ekonomis dibandingkan dengan hormon sintesis serta menurut Bowring (2011), terapi homon sintesis dapat menyebabkan kanker payudara dan penyakit kardiovaskular.

Fitoestrogen merupakan substrat tumbuhan yang memiliki aktifitas mirip hormon estrogen, aktifitas estrogenik dan mengikat reseptor estrogen serta meniru efek estradiol yaitu merangsang perkembangan sel osteoblast dalam pembentukan tulang (Pilsakova, 2010). Peran fitoestrogen dalam menurunkan osteoporosis telah diteliti, konsumsi fitoestrogentelah terbukti mencegah kerapuhan tulang. Selain itu, studi lain menunjukkan hasil yang sama dengan asupan fitoestrogen dapat menghambat kehilangan kalsium melalui urine pada kondisi menopause (Koswara, 2006). Kandungan isoflavon dalam ampas tahu adalah 220 mg, dan jumlah Daidzein 84 mg, dan Genistein 130 mg t (Jackson *et.,al* 2002). Deidzein dan genistein ini menurut studi memiliki fungsi yang mirip dengan estradiol dan mampu memperbaiki dan mencegah osteoporosis pada hewan coba model

ovariektomi, serta dapat dimanfaatkan sebagai preventif pada tikus model ovariektomi yang mengalami osteopenia, dan mampu mengurangi resiko osteoporosis (Hong, 2009). Ampas tahu efektif dalam mencegah terjadinya osteoporosis berdasarkan dari pembentukan trabekula dan berkurangnya akumulasi lemak serta jumlah osteoklas. Sehingga pemberian fitoestrogen dari ampas tahu dengan konsentrasi tinggi dapat mencegah osteoporosis pada hewan model tikus ovariektomi.

## **2.7 Susu Kambing Etawa**

Salah satu unsur mineral yang penting dibutuhkan oleh manusia maupun hewan adalah kalsium. Kalsium tersebut dibutuhkan oleh tubuh dalam pembentukan dan perawatan rangka tubuh yaitu tulang. Susu dan hasil olahannya merupakan sumber kalsium utama dan paling baik dari konsumsi kalsium harian. Konsumsi susu secara rutin dapat memenuhi kebutuhan kalsium harian. Susu kambing memiliki kelebihan dibanding dengan susu sapi untuk pemenuhan gizi. Susu kambing yang bersifat lebih homogen, mudah dicerna sehingga tidak menimbulkan alergi dibanding konsumsi susu sapi. Susu kambing juga memiliki nilai yodium yang lebih rendah dibandingkan dengan susu sapi, serta susu kambing memiliki kandungan kalsium yang tinggi yaitu sekitar 134 gr/ 100 ml. (Park, 2007). Kambing Etawa yang mampu beradaptasi dengan baik dan memiliki indeks reproduksi yang baik di Indonesia menjadi pilihan utama dalam peternakan susu kambing di Indonesia.

Susu kambing memiliki beberapa manfaat bagi tubuh diantaranya; Kandungan kalsium yang tinggi dapat menjaga kepadatan tulang, karena proses



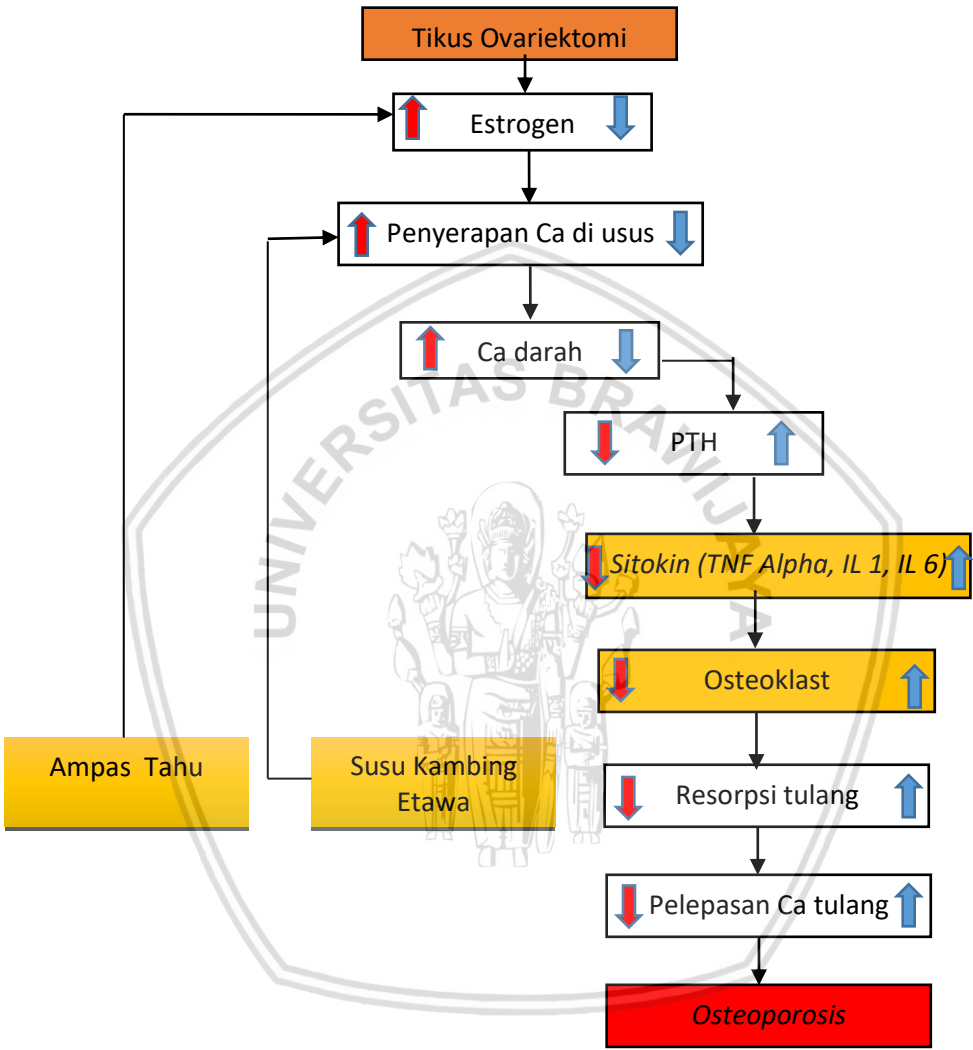
mineralisasi sel osteoblast dan bahan lainnya memerlukan kalsium dalam melakukan osifikasi (Pembentukan tulang keras), hal tersebut sesuai dengan studi yang dilakukan oleh (Tusmantoyo, 2014) menyatakan bahwa pemberian susu kambing dapat meningkatkan densitas dari tulang tikus sebagai hewan coba. Manfaat susu kambing lainnya yaitu: untuk pemberian penyakit TBC, membantu memulihkan orang yang baru sembuh dari sakit, mampu mengontrol kadar kolesterol dalam darah, dan baik untuk kesehatan kulit (Ferichani, 2011).



### BAB III

## KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konsep Penelitian



**Gambar 3.1** Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:

- : Variabel Bebas
- : Variabel yang Diamati
- ↓ : Perlakuan Ovariectomi
- ↓ : Efek pemberian Ampas Tahu dan Susu Kambing Etawa
- : Menstimulasi



Tindakan ovariectomi pada hewan coba tikus menimbulkan penurunan estrogen dalam darah, estrogen merupakan hormon yang dihasilkan oleh folikel ovarium, sel teka interna, korpus luteum dan juga disintesis oleh ekstrasgonad seperti jaringan adipose dan kulit, osteoblast dan kondrosit, endotelium vascular (Baqi, 2013). Hormon ini berperan dalam meregulasi osteoblast dan menghambat aktivitas osteoklastik dengan reseptor estrogen dari osteoblast dan osteoklast yang mengatur pembentukan remodeling tulang (Lerner, 2006). Penurunan hormon estrogen menyebabkan penyerapan kalsium dalam usus berkurang dan reabsorpsi kalsium di ginjal menurun, akibat dari penurunan 1,25-dihidroksisiferol menyebabkan kalsium dalam darah mengalami penurunan. Penurunan kalsium di dalam darah mempengaruhi terjadinya homeostasis kalsium yang dipengaruhi oleh 3 faktor yaitu: Hormon paratiroid, hormon kalsitonin, serta vitamin D3 (*1,25-dihydrocalciferol*) (DeGaris dan Lean, 2008). Paratiroid hormon merespon turunnya Ca di dalam darah melalui ginjal dengan cara meningkatkan reabsorpsi kalsium di tubulus dan peningkatan absorpsi kalsium pada usus dengan bantuan *calcitriol* (*1,25-dihydrocalciferol*), 1,25-dihidroksisiferol merupakan bentuk vitamin D paling aktif yang diproduksi dalam ginjal. Vitamin D aktif ini menyebabkan terbentuknya protein pengikat kalsium di sel-sel epitel usus. Protein tersebut berfungsi untuk mengangkut kalsium ke dalam sitoplasma sel. Namun akan terjadi *feedback negative* oleh kelenjar tiroid dengan melepaskan hormon kalsitonin yang mengatur menurunkan kadar kalsium dalam darah dengan menghambat degradasi osteoklas yang merangsang penyerapan kalsium oleh tulang

dan juga menghambat reabsorpsi kalsium ditubulus ginjal sehingga kemungkinan ada yang diekresikan melalui urin (Davey, 2013).

Defisiensi hormon estrogen menstimulus sekresi sitokin yang akan mengaktivasi osteoklas untuk merangsang resorpsi tulang akibat peningkatan Paratiroid hormon. Terutama Tumor Necrosis Alpha yang merupakan sitokin yang menyebabkan destruksi tulang dengan bekerja secara langsung dalam diferensiasi dan maturase osteoklast serta secara tidak langsung mengekspos matriks tulang (Aruan, 2015). Peningkatan resorpsi tulang menyebabkan sel sel osteoblast menjadi terdegradasi oleh osteoklas, sehingga kalsium akan dilepaskan dari sel sel tulang (demineralisasi) untuk diangkut ke dalam darah dan juga menyebabkan jumlah sel tulang osteosit akan menurun. Hal tersebut menyebabkan pengeroposan tulang yang berkelanjutan menjadi osteoporosis.

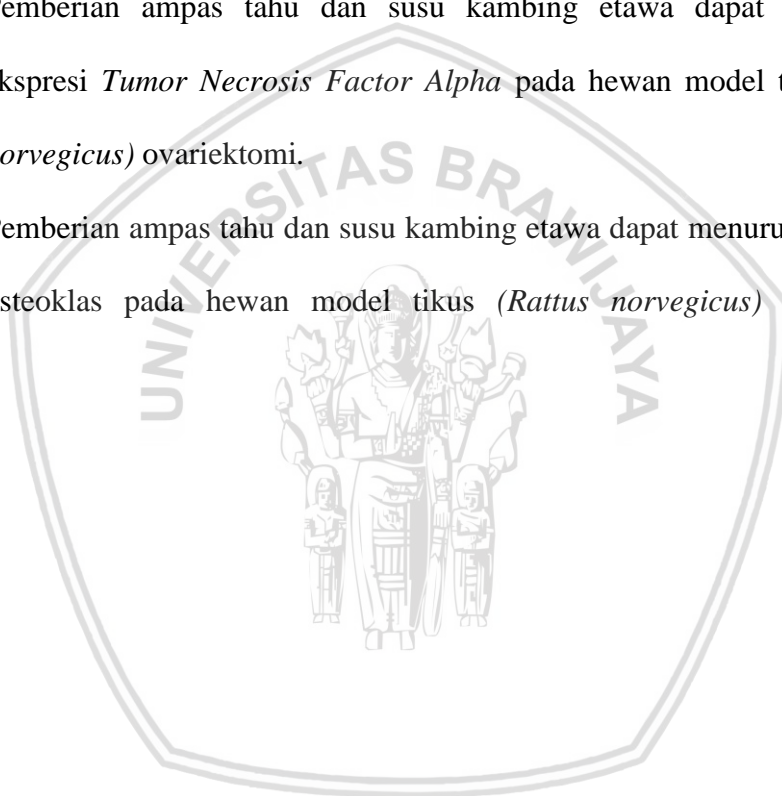
Pemberian ampas tahu dan susu kambing etawa pada kondisi tidak ada estrogen (estradiol) akibat ovariectomi, diharapkan dapat menggantikan fungsi dari estrogen dalam melakukan metabolisme kalsium dalam tulang. Ampas tahu mengandung fitoestrogen, yang memiliki reseptor sama dengan estrogen serta susu kambing etawa yang mengandung kalsium diharapkan memberi feedback positif dalam perbaikan kepadatan tulang. Meningkatnya estrogen dalam darah juga akan memicu peningkatan kalsitonin dan penyerapan kalsium melalui 1,25-dihidroksikalsiferol. Sehingga sekresi PTH berkurang dan aktivitas osteoblas meningkat untuk melakukan diferensiasi dan mensintesis matriks tulang baru. Peningkatan kadar kalsium akan menstimulasi kalsitonin sebagai faktor pembentukan osteoblast di tulang, sehingga proses remodeling tulang akan stabil

yang diharapkan memperbaiki kepadatan tulang pada tikus model ovariektomi sehingga tidak mengalami osteoporosis.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut:

1. Pemberian ampas tahu dan susu kambing etawa dapat menurunkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) ovariektomi.
2. Pemberian ampas tahu dan susu kambing etawa dapat menurunkan jumlah osteoklas pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) ovariektomi.



## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April–Juli 2017 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Brawijaya Malang, Politeknik Negeri Malang, Rumah Sakit Hewan Pendidikan (RSHP) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.2 Alat dan Bahan

##### 4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain adalah kandang hewan individu, penutup kawat, sonde lambung, tempat minum, rak kandang, timbangan badan digital, spuit 2 ml, kapas, *suture needle*, *scalpel*, *blade*, *arteri clamp*, *needle holder*, mikroskop, *object glass*, cawan petri, labu ukur, corong, Erlenmeyer, autoclave, mesin x-rays, timer, lemari pendingin, pengaduk kaca, sentrifus.

##### 4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain tikus betina galur Wistar, pakan basal rendah kalsium, sekam kandang, air minum *ad libitum*, ampas tahu, susu kambing etawa, aquades, ketamin, xylazine, alkohol 70 %, benang *catgut*, benang silk, antibiotik Nebacetin, kasa steril, *plester bandage*, formalin buffer 10 %, alkohol 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, dan 90 %, *alcohol absolute*, xylene,

bahan pewarna HE, antibodi primer, antibodi sekunder, paraffin, *cover glass*, *object glass*, *coating buffer*, mikrotom, *hot plate*.

#### 4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Ovariectomi pada hewan coba tikus
3. Persiapan bahan penelitian
4. Perlakuan ampas tahu dan susu kambing etawa pada hewan coba
5. Analisa jumlah sel osteoklast
6. Analisa *Tumor Necrosis Factor Alpha*
7. Analisa Data

#### 4.4 Prosedur Kerja

##### 4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok tikus tanpa perlakuan (Kelompok A), kelompok tikus dengan perlakuan ovariectomi saja (Kelompok B), kelompok tikus ovariectomi dengan perlakuan ampas tahu (Kelompok C), kelompok tikus ovariectomi dengan pemberian susu kambing etawa saja (Kelompok D), dan kelompok tikus ovariectomi dengan pemberian kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa (E).

Variabel yang diamati pada penelitian ini antara lain: variabel bebas (perbedaan pemberian yang diberikan pada masing-masing kelompok), variabel tergantung (*TNF Alpha* dan jumlah sel osteoklast jaringan tulang mandibula), dan variabel kontrol (ovariectomi, jenis kelamin, umur, berat badan, dan pakan). Estimasi berat sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2010):

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 15+5$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok (terdiri

dari 5 macam perlakuan)

n = jumlah ulangan yang

diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk perlakuan sejumlah 4 macam perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 5 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

Subjek penelitian menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar berumur 8-12 minggu. Berat badan tikus berkisar 180-200 gram. Hewan coba didapat dari laboratorium Farmakologi di Universitas Muhammadiyah Malang. Setelah itu, hewan coba diadaptasi terhadap lingkungan selama 7 hari, dengan pemberian pakan basal dan minum *ad libitum* pada semua tikus. Tikus dikandangkan dalam kandang dari bak plastik yang dilengkapi penutup kawat, dengan ukuran kandang 17,5x 23,75x 17,5 cm yang diberi alas sekam padi agar lingkungan kandang tidak lembab.

#### 4.4.2 Persiapan Bahan Penelitian

##### 4.4.2.1 Persiapan Ampas Tahu

Ampas tahu didapatkan dari perusahaan Pabrik Tahu Legendaris 73, Sukun di daerah Malang. Ampas tahu kemudian dilakukan sterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 10-12 menit untuk menghilangkan bakteri yang kemungkinan ada didalamnya. Sterilisasi dilakukan

di laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Setelah itu bahan dilakukan uji kualitatif kandungan fitoestrogen di Laboratorim Teknik Pangan Polinema. Bahan yang akan diberikan pada hewan coba tikus selanjutnya disimpan pada pendingin dengan suhu  $-4^{\circ}\text{C}$ . Volume pemberian yang akan diberikan pada hewan coba sebanyak 0,159 g ditambahkan aquades sampai 0,3 ml (seperti pada Lampiran 5) menggunakan sonde lambung pada kelompok perlakuan ampas tahu (Kelompok C).

#### **4.4.2.2 Persiapan Susu Kambing Etawa**

Susu kambing etawa didapatkan dari pengusaha susu kambing etawa yang berada di Malang, dalam bentuk susu segar yang telah dikemas dalam botol 250 ml. Susu kambing etawa kemudian disimpan pada ruangan pendingin dengan suhu  $-4^{\circ}\text{C}$  sebelum dilakukan pemberian pada hewan coba tikus. Volume pemberian susu kambing etawa diberikan sebanyak 0,3 ml pada tiap tikus menggunakan sonde lambung (seperti pada lampiran 6).

#### **4.4.3 Ovariectomi Pada Hewan Coba Tikus**

Tikus wistar berjumlah 20 ekor dengan umur 8-12 minggu diadaptasi pada kandang selama 1 minggu dalam kondisi laboratorium. Setelah seminggu pasca adaptasi, dilakukan operasi ovariectomi (pengambilan ovarium) metode melakukan insisi pada daerah flank bagian kiri dan kanan. Sebelum itu tikus dianastesi menggunakan *ketamine* dan *xylazine* dengan masing-masing 0,02 ml/kg BB dan 0,02 ml/kg BB yang diberikan melalui intramuskular. Setelah tikus teranastesi, bulu daerah *flank* dicukur, dan dibersihkan menggunakan alkohol. Dilakukan insisi kulit dengan panjang kurang lebih 1-1,5 cm dilanjutkan insisi



jaringan subkutan sampai menembus lapisan muskulus, dinding abdomen dan jaringan lemak ditarik sehingga ovarium ikut terbawa keluar rongga abdomen. Ovarium diligasi menggunakan benang *cat gut chromic (absorbable)*. Ovarium yang telah diikat, dipotong untuk memisahkan dari tuba fallopi. *Tuba fallopi* yang tersisa dan organ yang ikut keluar abdomen dikembalikan ke rongga abdomen namun sebelum dimasukkan diberikan larutan NaCl Fisiologis untuk mengurangi pendarahan. Selanjutnya, dilakukan penjahitan pada muskulus dengan *cut gut chromic 3-0* dengan tipe jahitan menerus sederhana. Sedangkan kulit dijahit dengan benang *silk* dengan tipe jahitan terputus sederhana setelah muskulus dan kulit tertutup, diberi iodin sebagai antiseptik. Seiring pemberian perlakuan, dilakukan pengamatan foto *x-ray* setiap 7 hari selama 30 hari, hal ini dijadikan sebagai penunjang untuk melihat perubahan kepadatan tulang.

#### 4.4.4 Pemberian Perlakuan Hewan Coba

Pemberian perlakuan dilakukan langsung pasca operasi ovariectomi setelah 7 hari pada saat jahitan kering. Dosis ampas tahu yang diberikan pada kelompok perlakuan ampas tahu (Kelompok C) sebanyak 0,159 g dengan penambahan aquadest 0,3 ml melalui sonde lambung. Pemberian susu kambing etawa diberikan pada kelompok perlakuan susu kambing (Kelompok D) sebanyak 0,3 ml, dan kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa diberikan pada kelompok campuran (Kelompok E) sebanyak 0,159 g dan 0,3 ml dalam satu sonde. Pemberian rutin dilakukan 1 kali sehari pada pagi hari (pukul 09.00 WIB) selama 30 hari.



#### 4.4.5 Pengambilan Sampel Tulang Mandibula

Pengambilan tulang mandibula hewan coba tikus diambil pada 30 hari pasca ovariektomi. Pengambilan tulang mandibula hewan coba dilakukan pada semua kelompok A, B, C, D, dan E. Langkah awal yang dilakukan yaitu tikus euthanasi dengan cara dislokasi bagian leher kemudian dilakukan pembedahan dan pengambilan organ sekitar tulang mandibular. Tulang mandibula dibersihkan dari muskulus yang masih menempel. Kemudian, tulang mandibula disimpan ke dalam larutan *paraformaldehid* (PFA) 4% yang dicairkan dengan *PBS* pH 7.4 untuk pembuatan preparat histopatologi.

#### 4.4.6 Analisa Jumlah Sel Osteoklast

Analisa jumlah sel osteoklast dengan beberapa tahapan yaitu:

1. Pembuatan preparat Histologi *Hematoxylin Eosin* (seperti pada lampiran 3)
2. Pengamatan dan perhitungan jumlah sel osteoklast secara mikroskopik

Pengamatan dan perhitungan jumlah sel osteoklast dilakukan menggunakan mikroskop elektrik Olympus CX35 dengan perbesaran 100x dilanjutkan sampai 400x pada 5 lapang pandang.

#### 4.4.7 Analisa *Tumor Necrosis Alpha*

Analisa *Tumor Necrosis Alpha* pada tulang mandibula dilakukan dengan sebagai berikut:

1. Pewarnaan preparat *Imunohistokimia* (seperti pada lampiran 4)

## 2. Pengamatan *Tumor Necrosis Factor Alpha* pada tulang mandibula secara mikroskopik

Pengamatan ekspresi *TNF Alpha* menggunakan mikroskop elektrik CX35 Olympus dengan perbesaran 400x pada 5 lapang pandang. Kemudian dilakukan olah data lanjutan menggunakan aplikasi software *Imunoratio*.

### 4.4.8 Analisis Data

Analisa data yang didapatkan dalam penelitian ini berupa data kuantitatif. Data kuantitatif yang didapatkan yaitu jumlah osteoklast yang dilanjutkan perhitungan dan dianalisa dengan *OneWay ANOVA*. Data kuantitatif ekspresi *TNF Alpha* tulang mandibula juga akan disajikan dan dianalisis dengan *SPSS 16.0 Edition for Windows* dengan analisis ragam ANOVA dan apabila terdapat perbedaan nyata uji dilanjutkan dengan pembandingan berganda uji Tuckey atau beda nyata jujur (BNJ)  $\alpha = 0,05$ .

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1 Pengaruh Pemberian Ampas Tahu dan Susu Kambing Etawa Terhadap Ekspresi *TNF Alpha* Pada Tulang Mandibula Tikus (*Rattus Novergicus*) Pasca Ovariektomi

Pemberian ampas tahu dan susu kambing etawa berpengaruh nyata terhadap ekspresi *TNF Alpha* tulang mandibula tikus (*Rattus norvegicus*) model menopause pasaca ovariektomi. Hasil rata-rata ekspresi *TNF Alpha* pada preparat pewarnaan IHK menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan (**Tabel 5.1**).

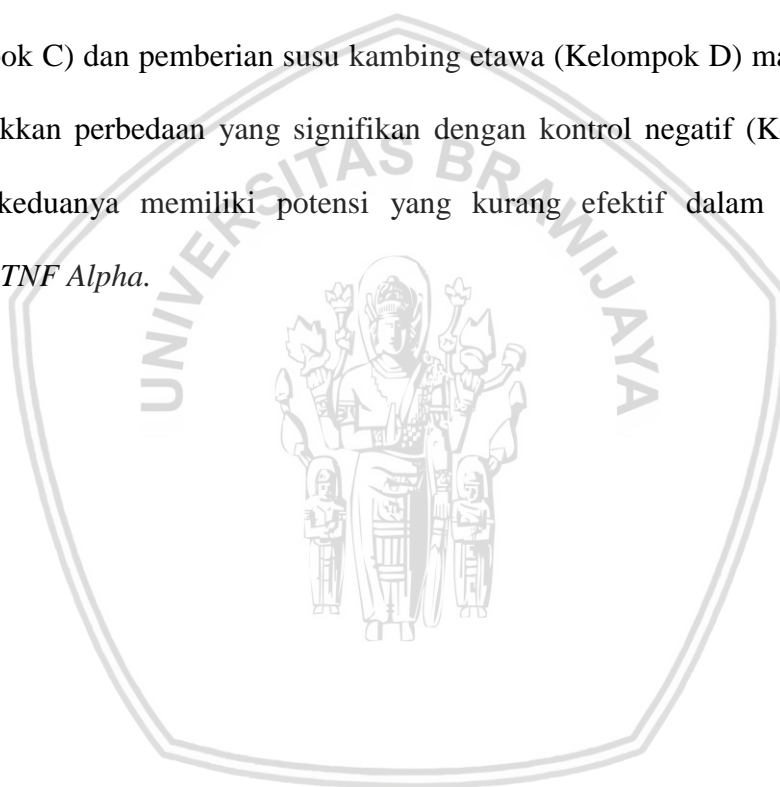
**Tabel 5.2** Rata-rata Ekspresi *TNF Alpha* masing-masing kelompok perlakuan

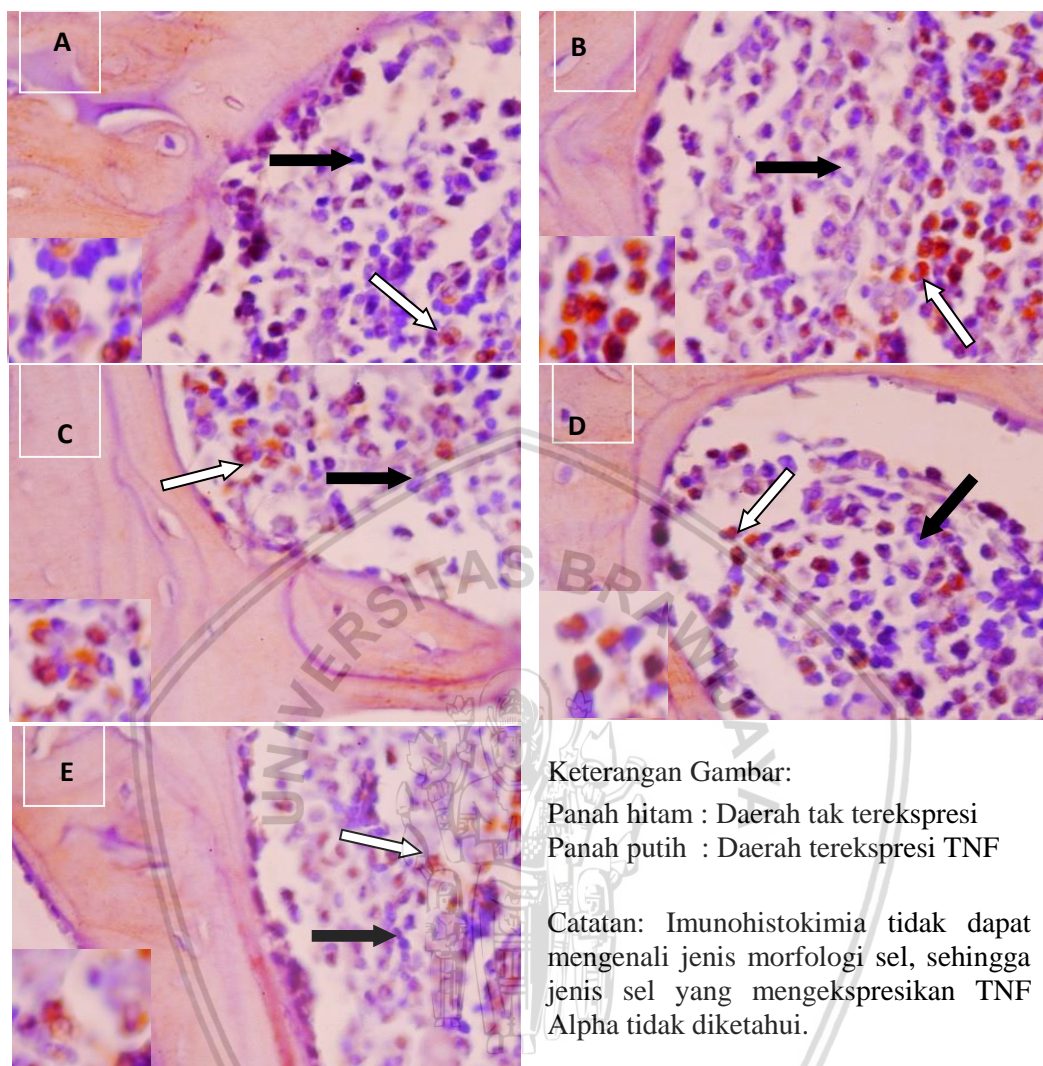
Kelompok Perlakuan	Rata rata (%) $\pm$ SD
Kontrol negatif (A)	16,76 $\pm$ 2,30 <sup>a</sup>
Kontrol positif (B)	46,58 $\pm$ 2,22 <sup>d</sup>
Ampas Tahu 0,159 g (C)	26,07 $\pm$ 3,78 <sup>b</sup>
Susu Kambing Etawa 0,3 ml (D)	34,74 $\pm$ 2,66 <sup>c</sup>
Kombinasi (AT 0,159 g + SKE 0,3 ml) (E)	19,52 $\pm$ 1,89 <sup>a</sup>

Keterangan: Notasi berbeda pada kolom di atas menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan terhadap ekspresi *TNF Alpha* ( $p < 0,05$ ).

Berdasarkan hasil uji beda nyata (BNT) pada **Tabel 5.2** dapat dijelaskan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok kontrol negatif (Kelompok A), kontrol positif (Kelompok B), pemberian ampas tahu (Kelompok C), pemberian susu kambing etawa (Kelompok D), pemberian kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa (Kelompok E) terhadap ekspresi *TNF Alpha* ( $p < 0,05$ ). Namun, pemberian kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa (Kelompok E) tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif (Kelompok A),

artinya kelompok tersebut memiliki potensi dalam menurunkan ekspresi *TNF Alpha* pada resorpsi di dalam jaringan tulang seperti pada keadaan normal (kontrol negatif). Peran fitoestrogen yang bekerja seperti estrogen mampu mengembalikan kadar kalsium darah yang menurun dengan meningkatkan penyerapan di usus, dan asupan kalsium dalam susu kambing mampu menjaga kebutuhan kalsium dalam tubuh. Sedangkan pada pemberian ampas tahu (Kelompok C) dan pemberian susu kambing etawa (Kelompok D) masing masing menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kontrol negatif (Kelompok A), artinya keduanya memiliki potensi yang kurang efektif dalam menurunkan ekspresi *TNF Alpha*.





**Gambar 5.1** Perbedaan Hasil Pengamatan Preparat Histologi ekspresi *TNF Alpha* Tulang Mandibula pada Semua Perlakuan, A= kelompok kontrol negatif; B= kelompok kontrol positif; C= kelompok tikus ovariectomi dan diberikan ampas tahu 0,159 g ditambah aquades 0,3 mL; D= kelompok tikus ovariectomi dan diberikan susu kambing etawa (0,3 mL); E= kelompok tikus ovariectomi dan diberikan kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa (0,3 mL). (Pewarnaan Imunohistokimia, Perbesaran 400x).

Kelompok kontrol negatif (Kelompok A) menunjukkan ekspresi *TNF Alpha* paling rendah (16,76%,) daripada kelompok perlakuan yang lain (**Gambar 5.2**), hal tersebut dikarenakan pada kelompok A tidak dilakukan ovaroktomi sehingga kadar estrogen masih normal dan kelompok yang digunakan sebagai standar normal. Kelompok kontrol negatif masih terjadi produksi sitokin *TNF Alpha*, hal ini dibutuhkan dalam proses *remodelling*). *TNF Alpha* yang terdapat dalam



jaringan tulang, memiliki peran penting dalam menjaga keseimbangan *remodelling* tulang, dimana TNF Alpha dapat mempengaruhi kerja sel sel tulang yaitu menghambat diferensiasi sel osteoblast dan aktivasi sel osteoklast (Kitaura, 2013).

Peningkatan *TNF Alpha* dapat menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan proses *remodeling* tulang, terjadi dominasi aktivitas osteoklast dalam meresorpsi tulang daripada aktivitas sel osteoblast dalam melakukan pembentukan tulang (Osta, 2014). *TNF Alpha* juga mengekspos sel tulang yang nantinya akan diperbarui oleh sel osteoblast baru (Aruan, 2015).

Kelompok perlakuan ovariectomi (Kelompok B) menunjukkan ekspresi *TNF Alpha* dengan rata-rata yang paling tinggi yaitu 48,58%. Pada gambar di atas tampak ekspresi *TNF Alpha* pada sel osteoklast lebih banyak. Hal tersebut disebabkan oleh perlakuan ovariectomi, menyebabkan estrogen dalam tubuh mengalami penurunan. Defisiensi estrogen secara tidak langsung menyebabkan terjadinya rangsangan terhadap Paratiroid hormon memproduksi sitokin, salah satunya *TNF Alpha*. Hal ini disebabkan karena terjadi penurunan kadar kalsium di dalam darah. *TNF Alpha* berperan penting dalam resorpsi tulang dengan cara meningkatkan produksi *RANK-L* dalam sel osteoblast, yang selanjutnya dibutuhkan untuk osteoklastogenesis. Ikatan kompleks *RANK-L* dengan reseptornya *RANK* pada progenitor osteoklast akan mengaktifasi dan dieferensiasi sel osteoklast menjadi sel osteoklast dewasa (Kitaura, 2013).

*TNF Alpha* dibutuhkan dalam proses remodeling tulang dengan cara mempercepat apoptosis sel osteoblast sehingga aktifitas pembentukan tulang baru

tidak seimbang dengan aktifitas osteoklast yang meningkat seiring meningkatnya *TNF Alpha*. Ekspresi *TNF Alpha* dapat ditekan dengan adanya pengaruh dari hormon estrogen yang cukup, pada keadaan normal estrogen mampu menekan osteoklastogenesis secara tidak langsung dengan menginduksi sel osteoblast untuk memproduksi *osteoprotegerin* (*OPG*). *Osteoprotegerin* ini nantinya akan bertindak sebagai kompetitor dari *RANK* untuk mengikat *RANK-L* dalam proses pematangan osteoklast dewasa (Aruan, 2015).

Keberadaan osteoprotegerin dalam menekan osteoklastogenesis mampu mengurangi dampak resorpsi tulang yang berlebihan sehingga menyebabkan osteoporosis. Pengaruh fitoestrogen mampu menekan produksi sitokin tersebut. Fitoestrogen berperan mirip seperti estrogen alami dalam mengikat reseptor estrogen, selanjutnya respon tergantung pada organ dan jaringan target (Atmaca, 2008).

Kelompok perlakuan ampas tahu (Kelompok C) menunjukkan ekspresi *TNF Alpha* yaitu 26,07%. Hal tersebut membuktikan bahwa pemberian ampas tahu mampu menekan ekspresi *TNF Alpha*. Asupan ampas tahu yang mengandung fitoestrogen, mempengaruhi kadar estrogen dalam tubuh. Meningkatnya estrogen dalam darah akan memicu peningkatan kalsitonin dan penyerapan kalsium melalui 1,25 dihidroksikalsiferol, sehingga sekresi PTH berkurang dan produksi *TNF Alpha* yang distimulasi oleh PTH dapat ditekan (Aruan, 2015).

Hasil pada kelompok perlakuan susu kambing (Kelompok D) menunjukkan ekspresi *TNF Alpha* 34,74%. Pemberian kalsium pada kelompok tersebut memiliki fungsi untuk menjaga asupan kalsium tubuh agar kadar kalsium dalam darah tidak



menurun. Tetap terjaganya keseimbangan kalsium di dalam darah dapat mencegah aksi dari paratiroid hormon dalam merangsang resorpsi kalsium di tulang untuk homeostasis kalsium ke dalam darah. Peningkatan paratiroid hormon juga menyebabkan terjadinya peningkatan produksi sitokin *TNF Alpha*, dalam menginduksi terjadinya resorpsi, sehingga secara tidak langsung kalsium juga mampu berperan dalam menurunkan *TNF Alpha* (Clouard, 2017).

Ekspresi *TNF Alpha* yang lebih tinggi dari kelompok perlakuan ampas tahu (Kelompok C) yang hanya sebesar 26,07%, disebabkan karena diet kalsium saja (pada kelompok perlakuan susu kambing etawa) tidak memberikan efek yang maksimal dalam menekan produksi *TNF Alpha*, hal ini dikarenakan tidak adanya asupan fitoestrogen seperti pada kelompok ampas tahu (Kelompok C). Fitoestrogen sebagai pengganti hormon estrogen berperan penting dalam metabolisme tubuh, salah satunya yaitu membantu penyerapan kalsium dalam usus dan meningkatkan mobilisasi ke dalam darah. Sehingga apabila terjadi defisiensi estrogen, maka dapat menyebabkan penurunan penyerapan dan mobilisasi kalsium dalam tubuh terutama ke dalam darah. Hal tersebut menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan kadar darah dan secara tidak langsung menyebabkan peningkatan *TNF Alpha* seperti penjelasan di atas (Yannis, 2012).

Pada kelompok perlakuan kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa (Kelompok E), menunjukkan efek yang lebih baik dalam menekan ekspresi *TNF Alpha* dengan nilai 19,52%, presentase tersebut mendekati hasil dari kelompok negatif (Kelompok A) dan berada dalam notasi yang sama. Hal tersebut

membuktikan bahwa perlakuan kelompok ini memiliki potensi dalam menurunkan produksi *TNF Alpha*.

Pemberian fitoestrogen memiliki fungsi yang penting pada kondisi defisiensi estrogen karena memiliki reseptor yang sama dengan estrogen. Fitoestrogen yang tersebar dalam darah akan memicu peningkatan kalsitonin dan penyerapan kalsium pada usus dengan adanya 1,25 dihidroksikalsiferol. Kondisi tersebut menyebabkan penyerapan kalsium dalam darah menjadi maksimal dan keseimbangan kalsium dalam darah terjaga, sehingga peningkatan hormon paratiroid dapat dicegah (Cepeda, 2017).

Peningkatan paratiroid hormon terjadi karena menurunnya kalsium dalam darah, sehingga diperlukan *in take* kalsium dalam tulang untuk menjaga keseimbangan kalsium. PTH dapat merangsang produksi *TNF Alpha* yang berfungsi dalam differensiasi sel osteoklas menuju jaringan untuk proses resorpsi. Menurut Sihombing (2012) mengatakan bahwa fitoestrogen mampu menghambat resorpsi tulang dan produksi *TNF Alpha* dapat ditekan sehingga resorpsi tulang yang berlebihan dapat dihindari. Kebutuhan kalsium tubuh juga dipenuhi dengan asupan kalsium yang terdapat pada susu kambing etawa. Kandungan kalsium susu kambing yang sangat tinggi mampu menjaga kebutuhan kalsium dalam tubuh, terutama di dalam darah. Penurunan kalsium di dalam darah juga menjadi salah satu faktor yang menyebabkan peningkatan sitokin *TNF Alpha* yang juga berperan dalam proses terjadinya resorpsi seperti penjelasan di atas. Fitoestrogen dan diet kalsium yang tepat dapat mencegah kejadian osteoporosis pada kejadian menopause (Yannis, 2012).

Berdasarkan hasil penelitian terhadap ekspresi *TNF Alpha* dapat disimpulkan bahwa, kelompok kontrol positif menunjukkan nilai ekspresi *TNF Alpha* yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya. Sedangkan, pada kelompok susu kambing etawa (Kelompok D), menunjukkan ekspresi *TNF Alpha* yang masih lebih tinggi dari pada kelompok perlakuan ampas tahu (Kelompok C) dan perlakuan kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa (Kelompok E), hal ini menunjukkan bahwa diet kalsium yang berasal dari susu kambing etawa masih kurang maksimal dalam menurunkan ekspresi *TNF Alpha*.

Kelompok perlakuan ampas tahu (Kelompok C), meskipun terdapat kandungan fitoestrogen yang menggantikan peran estrogen dalam menekan aktifitas osteoklastogenesis dimana terdapat peran dari *TNF Alpha*, namun hal tersebut masih kurang maksimal dalam hubungan penurunan *TNF Alpha* yang terjadi, dibandingkan dengan kelompok perlakuan kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa (Kelompok E) yang lebih baik dalam memberikan efek menekan osteoklastogenesis berdasarkan rata-rata presentase *TNF Alpha*. Hal ini didukung oleh hasil dari nilai kelompok perlakuan kombinasi (Kelompok E) hampir mendekati nilai dari kelompok tikus kontrol negatif (Kelompok A) atau tidak berbeda signifikan (seperti pada Tabel 5.2).

## 5.2 Pengaruh Pemberian Ampas Tahu dan Susu Kambing Etawa Terhadap Jumlah Sel Osteoklast Tulang Mandibula Tikus (*Rattus Novergicus*) Pasca Ovariectomy

Hasil penelitian pengaruh pemberian ampas tahu dan susu kambing etawa terhadap jumlah sel osteoklast tulang mandibula tikus (*Rattus norvegicus*) pasca ovariectomy memiliki pengaruh yang nyata. Hasil rata rata jumlah sel osteoklast ditunjukkan oleh tabel berikut:

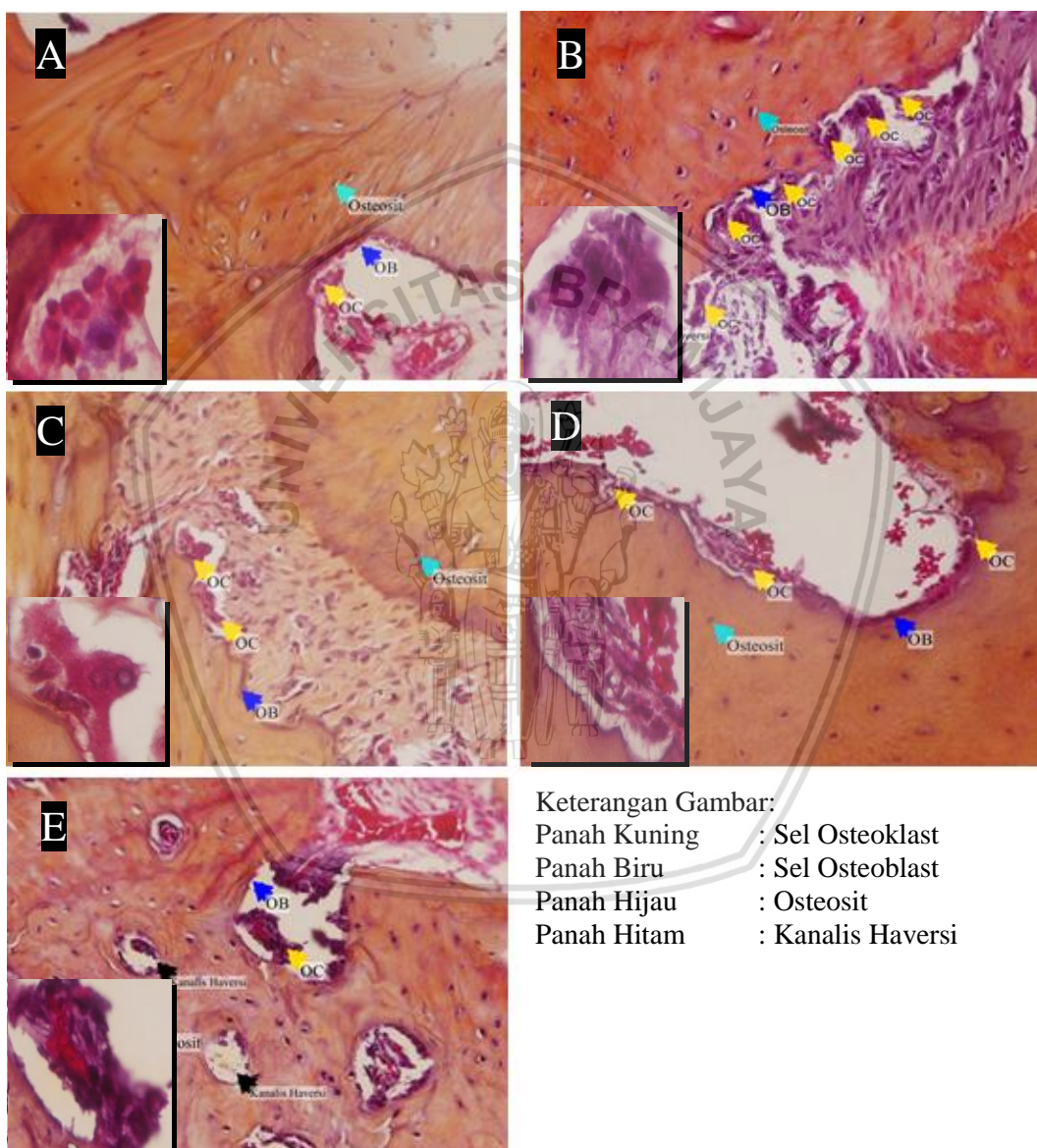
**Tabel 5.2** Rata-rata jumlah sel osteoklast pada masing masing perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rata rata (sel/ bidang pandang) $\pm$ SD
Kontrol negatif (A)	1,45 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
Kontrol positif (B)	3,20 $\pm$ 0,28 <sup>d</sup>
Ampas Tahu 0,159 g (C)	2,10 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>
Susu Kambing Etawa 0,3 ml (D)	2,67 $\pm$ 0,22 <sup>c</sup>
Kombinasi (AT 0,159 g + SKE 0,3 ml) (E)	1,65 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan terhadap jumlah sel osteoklast ( $p > 0,05$ ).

Berdasarkan hasil uji beda nyata (BNT) pada **Tabel 5.4** diatas, pada 5 kelompok kontrol negatif (Kelompok A), kontrol positif (Kelompok B), pemberian ampas tahu (Kelompok C), pemberian susu kambing etawa (Kelompok D), pemberian kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa (Kelompok E) menunjukkan hasil jumlah osteoklast yang berbeda. Namun, pemberian kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa (Kelompok E) menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan dengan kontrol negatif (Kelompok A), artinya kelompok tersebut memiliki potensi dalam menurunkan aktifitas jumlah sel osteoklast di dalam jaringan tulang seperti pada keadaan normal kontrol negatif. Sedangkan

pada pemberian ampas tahu (Kelompok C) dan pemberian susu kambing etawa (Kelompok D) masing masing perbedaan yang signifikan dengan kontrol negatif (Kelompok A), artinya keduanya memiliki potensi yang kurang efektif dalam menurunkan aktifitas jumlah sel osteoklast dalam jaringan tulang.



**Gambar 5.2** Perbedaan Hasil Pengamatan Preparat Histologi Sel Osteoklast Tulang Mandibula pada Semua Perlakuan, A= kelompok kontrol negatif; B= kelompok kontrol positif; C= kelompok tikus ovariektomi dan diberikan ampas tahu 0,159 g ditambah aquades 0,3 mL; D= kelompok tikus ovariektomi dan diberikan susu kambing etawa (0,3 mL); E= kelompok tikus ovariektomi dan diberikan kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa (0,3 mL). (Pewarnaan HE, Perbesaran 400x).



Kelompok kontrol negatif (Kelompok A), menunjukkan rata rata sel osteoklast yang paling sedikit yaitu dengan jumlah rata rata  $1,45 \pm 0,10$ . Hal ini disebabkan oleh kelompok tersebut masih memiliki organ ovarium lengkap sehingga produksi hormon estrogen masih dalam keadaan normal. Kadar estrogen tersebut mampu menghambat aktifitas differensiasi osteoklas. Hal ini berdasarkan penelitian (Killic, 2015), menyatakan bahwa estrogen merupakan hormon yang memiliki peran dalam prose pembentukan dan keseimbangan remodeling tulang.

Estrogen dapat menghambat proses aktivasi sel osteoklast dalam proses osteoklastogenesis sehingga menghambat defferensiasi sel osteoklast ke dalam jaringan tulang. Penghambatan dalam osteoklastogenesis menyebabkan resorpsi tulang dapat ditekan. Estrogen menjaga keseimbangan aktifitas osteoklast dan aktivitas osteoblast ini mencegah terjadinya penurunan kepadatan tulang (Khosla, 2013). Estrogen mengatur aktifitas sel osteoklast dengan menginduksi sel osteoblast agar memproduksi oateoprogeterin yang berperan dalam mengikat RANKL sehingga tidak terjadi ikatan kompleks dengan RANK dalam mengaktifasi defferiasiasi sel osteoklast (Zhao, 2012).

Berbeda pada kelompok perlakuan ovariektomi (Kelompok B) yang mengalami defisiensi estrogen akibat tidak adanya organ penghasil hormon estrogen utama yang menyebabkan peningkatan jumlah sel osteoklast yang cukup signifikan. Hasil menunjukkan rata rata jumlah sel osteoklast pada kelompok perkauan ovariektomi (Kelompok B) yaitu  $3,20 \pm 0,28$ . Menurut Siki (2009), yang menyatakan bahwa ovariektomi dapat menyebabkan osteoporosis pada tikus. Hal

tersebut berhubungan dengan meningkatnya jumlah osteoklast yang terdapat pada tulang tikus.

Estrogen bekerja dengan menekan differensiasi osteoklast yang sebelumnya telah dijelaskan pada bahasan di atas bahwa pembentukan osteoklast memerlukan interaksi antara RANK dan RANKL, namun hal itu dihambat dengan adanya osteoprotegerin (*OPG*) yang mampu mengikat RANKL sehingga interaksi kompleks RANKL dan RANK tidak terjadi. Osteoprotegerin (*OPG*) diproduksi oleh sel osteoblast yang distimulasi oleh estrogen dengan berinteraksi melalui reseptornya pada osteoblast (Sihombing, 2012). Peningkatan jumlah sel osteoklast menyebabkan dominasi aktifitas resorpsi tulang daripada aktifitas sel osteoklast, terlebih pada kelompok perlakuan ovariectomi (Kelompok B) tidak mendapat pemberian asupan hormon estrogen dan kalsium dari luar sehingga kepadatan tulang cenderung lebih cepat.

Prado (2014) menyatakan bahwa defisiensi estrogen akibat ovariectomi menyebabkan terjadinya peningkatan sel osteoklastik dikarenakan menurunnya produksi Osteoprotegerin dalam menghambat ikatan kompleks antara RANKL dan RANK dalam proses osteoklastogenesis dan terjadinya peningkatan sitokin sitokin yang berperan dalam resorpsi tulang, sehingga aktifitas sel osteoklast menjadi meningkat. Pada sel osteoblast juga mengalami penurunan aktifitas, terutama dalam merangsang produksi *Tumor Growth Factor Beta* (TGF Beta) yang berfungsi menarik sel sel osteoblast mengisi lubang lubang tulang untuk *remodeling* tulang yang terekspos oleh osteoklast.



**Gambar 5.4** di atas menunjukkan bahwa tikus kelompok perlakuan kontrol positif (Kelompok B) yang mendapat perlakuan ovariectomi tanpa pemberian ampas tahu dan susu kambing mengalami peningkatan sebanyak 3x sel osteoklast dari keadaan normal. Sedangkan kelompok perlakuan kombinasi ampas tahu dan susu kambing (Kelompok E) yang mendapatkan perlakuan pemberian ampas tahu dan susu kambing etawa mengalami penurunan sel osteoklast, karena dengan pemberian kombinasi tersebut dapat memenuhi kebutuhan hormon estrogen dengan fitoestrogen yang terkandung dari ampas tahu, dan asupan kalsium daripada susu kambing etawa sehingga lebih efektif dalam mencegah osteoporosis.

Fitoestrogen sebagai terapi sulih hormon dapat menjadi hormon pengganti estrogen dengan cara memodulasi reseptor estrogen didalam sitoplasma, sehingga terjadi kompleks hormon reseptor yang aktif. Kompleks hormon tersebut setelah masuk ke inti akan menimbulkan respon biologis tergantung pada organ sasaran (Amran, 2012). Ketika organ sasarannya adalah tulang, maka hal tersebut berhubungan dengan metabolisme tulang. Fitoestrogen berperan sebagai estrogen didalam jaringan tulang memiliki peranan penting dalam mempengaruhi aktivitas sel tulang yaitu; sel osteoblast dan sel osteoklast melalui reseptor di dalam sitosol (Laswati, 2015).

Kelompok perlakuan ampas tahu (Kelompok C) menunjukkan hasil  $2,10 \pm 0,11$ , pemberian susu kambing etawa tersebut dimaksudkan memberikan asupan fitoestrogen yang terkandung dalam ampas tahu. Fitoestrogen merupakan senyawa yang memiliki kemiripan dengan estrogen alami di dalam tubuh, sehingga dapat mengatasi defisiensi estrogen akibat perlakuan ovariectomi.

Dalam perannya fitoestrogen berikatan dengan reseptor dalam tubuh tikus dan menggantikan peran estrogen alami.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Weaver (2009), bahwa fitoestrogen dapat menekan aktifitas resorpsi pada tulang, sehingga mencegah terjadinya osteoporosis pada kondisi *post menopause*. Kaitannya terhadap jumlah sel osteoklast, fitoestrogen akan menginduksi sel osteoblast untuk memproduksi osteoprotegerin yang akan berkompetisi dengan RANK dalam melakukan ikatan sehingga proses osteoklastogenesis dapat dihambat. Estrogen menekan ekspresi RANK-L dari sel osteoblast, dan mencegah terjadinya ikatan kompleks antara RANK-L dan RANK dengan memproduksi *Osteoprotegerin*, sehingga berkompetisi dengan RANK dan mengakibatkan pematangan osteoklast terhambat, serta menghambat produksi sitokin yang merangsang diferensiasi sel osteoklas seperti: IL-6, IL-1, IL-11, dan *TNF Alpha*. Telah diketahui bahwa estrogen memiliki peranan penting dalam menekan diferensiasi sel osteoklast serta mempercepat apoptosis sel osteoklast.

Estrogen juga berpengaruh pada osteoblast dalam proses pembentukan tulang dengan merangsang produksi *Tumor Growth Factor Beta* (TGF Beta) kemudian berikatan dengan reseptor di dalam osteoblast yang merangsang proses remodeling tulang dan membentuk osteoblast baru pada tulang. Selain itu, estrogen mampu meningkatkan absorpsi kalsium dalam tubuh sehingga menekan peningkatan hormon paratiroid dalam menginduksi produksi sitokin sitokin seperti *TNF Alpha*, IL 1, IL 6 yang berperan dalam resorpsi tulang (Zhang, 2017).

Hasil jumlah rata rata osteoklast pada kelompok perlakuan susu kambing etawa (Kelompok D) yaitu  $2,67 \pm 0,22$ , terjadi penurunan jumlah sel osteoklast dari pada kelompok perakuan ovariectomi (Kelompok B). Pemberian ampas tahu dimaksudkan untuk memberi asupan kalsium dalam tubuh akibat defisiensi estrogen pasca ovariectomi. Sehingga kadar kalsium di dalam darah tidak menurun dan mencegah proses resorpsi kalsium pada tulang dalam menormalkan kembali kadar Ca dalam darah. Penurunan kadar kalsium darah dapat menyebabkan meningkatnya paratiroid hormon, dalam proses lanjut akan menyebabkan proses osteoklastogenesis dalam aktivasi dan differensiasi sel osteoklast dalam tulang meningkat (Christakos, 2010). Oleh karena itu asupan kalsium juga sangat penting dalam menjaga kepadatan tulang agar terhindar dari osteoporosis.

Lanham (2008) menyatakan bahwa diet kalsium dapat mengurangi penurunan massa tulang akibat post menopause. Kalsium juga merupakan bahan utama dalam jaringan tulang sebagai pembentuk matriks bersama sel sel osteosit dalam tulang. Namun, Christakos (2010), menyatakan bahwa absorpsi kalsium dalam tubuh juga memerlukan hormon estrogen, hal ini berkaitan dengan fungsi estrogen dalam menstimulasi pembentukan vitamin D menjadi *calcitriol* didalam ginjal. *Calcitriol* berfungsi untuk mempercepat absorpsi kalsium di dalam sel sel epitel usus. Diet kalsium yang diberikan pada tikus ovariectomi tidak mendapat hasil maksimal karena kondisi defisiensi estrogen masih berlanjut akibat dari perlakuan ovariectomi. Sehingga absorpsi dan transport kalsium dalam intraseluler juga tidak maksimal. Oleh sebab itu pemberian perlakuan susu

kambing etawa saja kurang efektif dalam menjaga kepadatan tulang, kaitannya dalam menekan aktifitas osteoklast dalam proses resorpsi tulang.

Kelompok kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa (Kelompok E) menunjukkan rata rata jumlah osteoklast sebesar  $1,65 \pm 0,19$ . Pada kelompok ini terjadi penurunan jumlah sel osteoklast disbanding dengan kelompok perlakuan yang lainnya dan hampir mendekati jumlah rata rata osteoklast pada kelompok kontrol negatif (Kelompok A). Pemberian kombinasi tersebut lebih efektif dalam menekan aktifitas sel osteoklast pada tulang. Fitoestrogen yang bekerja seperti estrogen mampu memaksimalkan penyerapan kalsium dalam usus yang diperlukan sebagai bahan anorganik dalam membentuk jaringan tulang (Weaver, 2009).

Kalsium berperan penting di jaringan tulang, karena yang membuat tulang menjadi padat adalah adanya kandungan kalsium serta bahan organik dan anorganik lainnya yang mengalami pengerasan bersama dengan sel sel tulang yang disebut osteosit (Lanham, 2008). Proses osteoklastogenesis juga dapat dihambat dengan adanya fitoestrogen sehingga aktivasi sel osteoklast matang dapat dihambat (Sihombing, 2012). Sehingga kecenderungan dominasi aktifitas sel osteoklast tidak terjadi namun terjadi keseimbangan antara osteoblast dan osteoklast pada proses remodeling tulang. Estrogen juga berperan dalam mempercepat proses apoptosis sel sel osteoklast.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Wang, 2011), menyatakan bahwa fitoestrogen dapat menjadi hormon pengganti alternatif pada saat kondisi defisiensi estrogen (post menopause) serta asupan kalsium kedalam tubuh yang

cukup dapat menjaga kepadatan massa tulang dan meningkatkan pembentukan formasi tulang serta menghambat resorpsi tulang sehingga dapat mencegah kejadian osteoporosis. Susu kambing memiliki kandungan kalsium yang tinggi, memungkinkan terjadinya terjaganya proses remodeling tulang sehingga densitas tulang menjadi terjaga.

Mekanisme homeostatis kalsium di dalam tulang yang dipengaruhi oleh faktor hormon paratiroid, vitamin D dan kalsitonin yang dihasilkan oleh kelenjar tiroid. Apabila kadar kalsium dalam cairan ekstrasel rendah, maka hormon PTH akan merangsang pengambilan ion kalsium dalam tulang untuk mempertahankan kadar ion kalsium dalam plasma. Sebaliknya pada hormon kalsitonin yang kerjanya berlawanan dengan PTH. Pemberian susu kambing etawa ini dapat mempertahankan keseimbangan ion kalsium dalam plasma. Sehingga cadangan kalsium didalam tulang tidak diambil untuk menjaga keseimbangan kalsium dalam darah. Karena pengambilan kalsium dalam tulang terus-menerus dapat menyebabkan pengeroposan tulang (Tusmantoyo, 2014).

Terjadi peningkatan jumlah osteoklasat pada setiap kelompok perlakuan yang berbeda yaitu: hasil rata-rata jumlah sel osteoklast pada kelompok kontrol positif (Kelompok B) dengan diberi perlakuan ovariektomi saja sebesar 3,20 sel/ bidang pandang, meningkat hampir hingga 3 kali lebih banyak dari jumlah sel osteoklast pada kelompok negatif (Kelompok A) yaitu 1,45 sel/ bidang pandang. Hal tersebut disebabkan tidak tercukupinya hormon estrogen untuk dapat menghambat sel osteoklast berdiferensiasi ataupun beraktifitas. Hal tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa ovariektomi dapat menyebabkan

insiden penyakit osteoporosis karena meningkatkan aktifitas sel osteoklast dalam menyerap kalsium dalam tulang dan menekan sel osteoblast dalam pembentukan tulang (Wongdee, 2011). Kelompok perlakuan susu kambing etawa (Kelompok D) menunjukkan sel osteoklast yang masih lebih banyak dari pada kelompok perlakuan ampas tahu (Kelompok C) dan kelompok perlakuan kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa (Kelompok E), hal ini menunjukkan perlakuan pemberian susu kambing etawa dalam mencegah peningkatan osteoporosis kurang efektif. Asupan kalsium saja tidak mengubah kondisi defisiensi estrogen yang berperan penting dalam metabolisme tulang, karena absorpsi kalsium tidak maksimal pada kondisi tersebut.

Berkurangnya hormon estrogen tersebut dapat dipenuhi dengan pemberian fitoestrogen untuk menyeimbangkan kebutuhan hormon estrogen. Karena fitoestrogen memiliki kemiripan fungsi dengan reseptor estrogen. Hal ini ditunjukkan oleh rata rata jumlah sel osteoklast yang mengalami penurunan dengan perlakuan pemberian kombinasi (ampas tahu dan susu kambing etawa) yang lebih baik dan efisien dalam mencegah peningkatan osteoklast daripada pemberian ampas tahu saja atau susu kambing saja.

Menurut Sitasiwi (2009), kandungan fitoestrogen yang terdapat pada fitoestrogen dapat bekerja dengan berikatan pada reseptor estrogen alami dan bekerja memenuhi kekurangan hormon estrogen akibat tidak adanya ovarium sebagai penghasil estrogen. Hormon estrogen tersebut berperan dalam metabolisme tulang terutama kalsifikasi yang berarti estrogen melindungi dan mencegah proses osteoporosis pada tulang sehingga tetap padat dengan menjaga



resorpsi kalsium dan fosfor pada tulang dengan menghambat differensiasi sel osteoklast yang dapat menyebabkan pengeroposan tulang (Sutrisno, 2006).

Berdasarkan hasil yang telah didapat pada penelitian ini, dapat dinyatakan bahwa kelompok perlakuan kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa lebih efektif daripada kelompok perlakuan yang lain. Hal ini disebabkan adanya pengaruh fitoestrogen yang bekerja seperti estrogen tubuh dan diet kalsium yang berfungsi memenuhi kebutuhan kalsium dalam darah. Perlakuan kelompok perlakuan susu kambing etawa (Kelompok D), asupan kalsium tidak terabsorpsi secara maksimal akibat menurunnya estrogen dalam tubuh pasca ovariectomi, sedangkan pada kelompok perlakuan ampas tahu (Kelompok C) menunjukkan penurunan jumlah rata rata sel osteoklast. Namun, pada kelompok perlakuan ampas tahu (Kelompok C) kurang efektif, dikarenakan asupan kalsium dari luar tidak diberikan. Penjelasan sebelumnya telah dijelaskan bahwa defisiensi estrogen pasca ovariectomi dapat menyebabkan penurunan kadar kalsium dalam darah yang menjadi awal dari proses resorpsi kalsium dalam tulang terjadi.



## BAB VI

### KESIMPULAN

#### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa dapat menurunkan ekspresi *TNF Alpha* dari tulang mandibula tikus pasca ovariectomi kembali seperti keadaan tikus normal (kontrol negatif).
2. Pemberian kombinasi ampas tahu dan susu kambing etawa dapat menurunkan jumlah osteoklast dalam tulang mandibula tikus pasca ovariectomi, kembali seperti keadaan tikus normal (kontrol negatif)

#### 6.2 Saran

1. Perlu dilakukan pengukuran kadar fitoestrogen (daidzein dan genistein) dari ampas tahu untuk mengetahui secara pasti nilai kadar fitoestrogen pada ampas tahu.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adiyati, PN. 2011. *Ragam Jenis Ektoparasit Pada Hewan Coba Tikus Putih (Rattus norvegicus) Galur Sprague Dawley*. Bogor.
- Aruan, Sara Yosephine, Askaroellah Aboet, Devira Zahara, Aliandri, Abdul Rachman Saragih. 2015. *Hubungan ekspresi Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) dengan destruksi tulang akibat kolesteatoma*. ORLI Vol. 45 No. 1. Departemen Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala Leher. Medan
- Anderson PH, Sawyer RK, Moore AJ, May BK, O'Loughlin PD, Morris HA. 2008. *Vitamin D Depletion Induces RANKL-Mediated Osteoclastogenesis And Bone Loss In A Rodent Model*. J Bone Miner Res;23(11):1789-97.
- Bowring CE. 2011. *Francis RM. National osteoporosis society's position statement on hormone replacement therapy in the prevention and treatment of osteoporosis*. Menopause Int;17(2):63-5.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. 2003. *Osteoclast Differentiation And Activation*. Nature. 423: 337-342
- Cheng, Fang Ping, Kun Chuang Wang, Jing Duan Huang. 2009. *Effect of Estrogen On Activity and Growth Of Osteoclast Human In Vitro*. Taiwan. Obstet Gynecol; 48(4):350-355.
- Christakos Sylvia, Ph.D., Dare V. Ajibade, et.al. *Vitamin D: Metabolism*. Endocrinal Metab Clin North Am. 39 (2); 243-253.
- Clarke, Bart. 2008. *Normal Bone Anatomy and Physiology*. Rochester. Minnesota
- Cosman, Fellicia , M.D. 2009. *Osteoporosis*. Bentang Pusta: Yogyakarta.
- Colville T., dan J.M Bassert. 2002. *Clinical Anatomy and Physiology for Veterinary technicians*. St Louis Mosby, Inc.
- Cummings-Vaughn L, Grammack J. Falls. 2011. *Osteoporosis and hipfractures*. Med Clin North Amer;95(3):495-506.
- Davey RA, Findlay DM. 2013. *Calcitonin: Physiology Or Fantasy?*. J Bone Miner Res 28(5):973-9z.
- Elsabaa, Prof. Dr. Heba M. 2012. *Development and Growth of the Mandible*. Oral Biology.
- Ferichani, M. 2011. *Inovasi Produk Es Krim Susu Kambing Etawa-Ubi Ungu*. UNS. Semarang.

- Hernawati. 2008. *Perbaikan Kinerja Reproduksi Akibat Pemberian Isoflavon dari Tanaman Kedelai. Skripsi.* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Pendidikan Indonesia: Bandung.
- Hunt, J., Curtiss, H., Zito, C., Idso, J., Johnson. L. 2008. *Calcium Requirements of Growing Rats Based on Bone Mass, Structure, or Biomechanical Strength Are Similiar.* The Journal of Nutrition. 1462-1468.
- Killic, Tullay Okman. 2015. *Estrogen and Deficiency and Osteoporosis.* Intech Publish
- Lanham, Susan A. 2008. *Importance of Calcium, Vitamin D and Vitamin K for Osteoporosis Prevention and Treatment.* Proceeding of Nutrition Society 67: 163-176.
- Manolagas, Stavros C., Charles A. O'Brien, and Maria Almeida. 2013. *The Role of Estrogen and androgen Receptors In Bone Health and Disease.* HHS Public.
- Marini H, Minutoli L, Polito F, Bitto A, Altavilla D, Atteritano M, et al. 2007. *Effects of the phytoestrogen genistein on bonemetabolism in osteopenic postmenopausal women.* Ann Intern Med;146(1):839-47.
- Maulina, Noura. 2010. *Penilaian Tnf-Alpha Pada Hati Mencit Jantan Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Manggis Garcinia Mangostana L Dengan Metode Imunohistokimia.* Departement Of Medicine.
- Meita, Shanty. 2011. *Silent Killer Deseases.* Yogyakarta: Javalitera
- Nakamura T1, et al. 2007. *Estrogen Prevents Bone Loss Via Estrogen Receptor Alpha And Induction Of Fas Ligand In Osteoclasts.* Cell 7;130(5):811-23. Published by Elsevier Inc.
- Syarifah, 2007. *"Suke" Sisi Lain Kedelai. Bandung Pikiran Rakyat.* Bandung
- Olszta Matthew, Xingguo Cheng, Sang Soo Jee, Rajendra Kumar, Yi-Yeoun Kim, Michael J. Kaufman, Elliot P. Douglas, Laurie B. Gower. 2007. *Bone Structure And Formation: A New Perspective.* Elsevier. USA
- Park YW, Juarez M, Ramos M, Haenlein GFW. 2007. *Physicochemical characteristics of goat and sheep milk.* Small Rum Res 68: 88-113
- Pascal Michel and Olivier Lorvelec. 2006. *Rattus norvegicus.* Europe.
- Pilsakova L, Rieicansky, F. Jagla. 2010. *The Physiological Actions of Isoflavon Phytoestrogen.* Austria
- Prado, Renatha Falchete do. 2014. *Estrogen Deficiency and Bone Remodelling.* Austin Muscoscelet Disord: 1(1): 1-1001.

- Sabri, M. 2011. Aktivitas Ekstrak Etanol Batang Sipatah Patah (*Cissus Quadrangula Salisb*) Sebagai Antiosteoporosis Pada Tikus (*Rattus Novergiccus* {Skripsi}. Program Studi Sains Veteriner. Pascasarjana. IPB: Bogor.
- Shin HD, Kun JY, Bok RP. 2007. *Antiosteoporotic Effect Of Polycan, Glucan From Aurebassidium, In Ovariectomized Osteoporotice Mice*. J Nutr 23:853;860.
- Singer, FR, Eyre DR. 2008. *Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice*. Cleveland Clinic Journal; 75(10): 739-750.
- Sirois, M. 2005. Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures. Mosby, Inc. United States of America. Halaman 43 – 45
- Suwanti, LT., Mufasirin. 2015. *Peningkatan TNF-Alpha Dan Indeks Apoptosis Pada Tulang Mencit Yang Diinfeksi Toxoplasma gondii*. Jurnal Kedokteran Hewan ISSN: 1978-225X.
- Thomas, SDC. 2012. *Bone Turnover Markers*. Aust Prescr; 35: 156-158.
- Sihomibing, Iknes, Sunny Wangko Sonny J. R. Kalangi. 2012. Peran Estrogen Pada Remodeling Tulang. Bagian Anatomi-Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi. Manado
- Setyorini, A, Suandi, I Sidiartha, dan Suryawan. 2009. *Pencegahan Osteoporosis dengan Suplementasi Kalsium dan Vitamin D pada Penggunaan Kortikosteroid Jangka Panjang*. Jurnal Sari Pediatri, Vol. 11, No. 1.
- Weaver CM, B.R. Martin, et. Al. 2009. Antiresorptive Effects of Phytoestrogen Supplements Compared with Estradiol. Or Risedronate in Postmenopouse Women Using Ca Methodology. The Endocrin Society:94 (10): 3798-3805.
- Zhang, Huicun, Nata. 2017. Effect of Isopsoralen on Smad7 in Osteoblastic MC3T3E. Experimental and Therapeutic Medicine: 14; 1561-1567.